

Aus dem
Institut für Genetik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. F. Kaudewitz

GEWINNUNG TEMPERATURSENSIBLER INDISPENSABLER
MUTANTEN VON NEUROSPORA CRASSA.

ANALYSE DES DEFEKTES ALS AUSFALL
DER RNS-SYNTHESE

EINER DIESER MUTANTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Marion Gross, geb. Slood
aus Waltershausen/Thüringen

München 1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klingmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 1975

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1971 bis 1974 am Institut für Genetik der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. F. Kaudewitz durchgeführt.

Am Ende dieser Arbeit möchte ich allen herzlich danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kaudewitz für die großzügige Förderung dieser Arbeit, sowie für seine zahlreichen Ratschläge. Herrn Dr. Schweyen danke ich für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen und Frau Schichtel für ihre hilfsbereite technische Assistenz. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein Dank für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. ERGEBNISSE	4
2.1. Isolierung und teilweise Charakterisierung induzierter ts^- -Mutanten von <i>Neurospora crassa</i>	4
2.1.1. Anwendung der Stempelmethode bei <i>Neurospora crassa</i>	4
2.1.2. Eigenschaften der Mutanten	6
2.2. Messung von Einbaukinetiken bei der Proteinsynthese	10
2.2.1. Kinetik des Einbaues markierten Leucins durch Zellen des ts^+ -Stammes bei verschiedenen Temperaturen	10
2.2.2. Einbau markierten Leucins in Zellen der temperatursensiblen Mutanten bei erlaubter und unerlaubter Temperatur	12
2.2.3. Kinetik des Beginns der Hemmung der ts^- -Mutante Nr. 30 nach Überführung in unerlaubte Temperatur	13
2.3. Einbaukinetiken der RNS- und DNS-Synthese	15
2.3.1. Einbau markierten Uridins in die RNS von col^- , ts^+ und col^- , ts^- (30) bei erlaubter und unerlaubter Temperatur	16
2.3.2. Kinetik der DNS-Synthese von col^- , ts^+ und col^- , ts^- , (30) bei erlaubter und unerlaubter Temperatur	18
2.3.3. Beginn der Hemmung der RNS- und DNS-Synthese der Mutante 30	19
2.4. Untersuchung der Reaktion der Mutante auf Rifampicin	21
2.4.1. Wirkung des Rifampicins auf die allgemeine RNS-Synthese des Wildtyps (col^+ , ts^+) von <i>Neurospora crassa</i>	22
2.4.2. Kinetik der RNS-Synthese der ts^- -Mutante mit und ohne Rifampicin	24

	Seite
2.4.3. Kinetik der DNS-Synthese der ts ⁻ -Mutante mit und ohne Rifampicin	25
2.4.4. Kinetik der Proteinsynthese der Mutante "30" bei Inkubation mit Rifampicin	27
2.5. Untersuchung der Wirkung von Cycloheximid (CHX) auf die Mutante "30"	29
2.5.1. Kinetik der Proteinsynthese ohne und mit Hemmung durch CHX	30
2.5.2. Kinetik der RNS-Synthese während der Inkubation ohne und mit CHX	32
2.6. Darstellung der Ribosomen in Saccharose-Dichtegradienten	34
2.6.1. Typisches Ribosomenprofil von <i>Neurospora crassa</i>	34
2.6.2. Wirkung von Rifampicin auf die Ribosomenprofile der Mutante	36
2.6.3. Ribosomenprofil der Mutante nach Inkubation bei un-erlaubter Temperatur	38
2.6.4. Ribosomenprofil der Mutante nach Inkubation mit CHX bei 36° C und 23° C	40
2.6.5. Untersuchung des Einbaues markierten Uridins in die RNS- von Mono- und Polysomen	43
3. DISKUSSION	47
3.1. Anwendung der Stempelmethode zur Isolierung rezessiver Mutanten von <i>Neurospora crassa</i>	47
3.2. Versuchsergebnisse, die auf einen primären temperatursensiblen Defekt der Transkription mit Sekundärwirkungen auf Protein- und DNS-Synthese schließen lassen	48
3.3. Hinweise für einen Defekt in der Synthese der messenger RNS	49
3.4. Verwendungsmöglichkeiten der Mutante für weitere Forschungen	51

	Seite
4. MATERIAL UND METHODEN	54
4.1. Materialien	54
4.2. Medien	54
4.3. Züchtung von <i>Neurospora crassa</i>	54
4.4. Inkubation mit Nitrosoguanidin	55
4.5. Isolierung und Reinigung der Mutanten	55
4.5.1. Kieselgelkulturen	56
4.6. Untersuchung der Keimungsfähigkeit	56
4.7. Inkorporation und Radioaktivitätsmessung des markierten Leucins und Uridins	57
4.8. Darstellung der Ribosomen im Saccharose-Dichtegradienten	58
5. ZUSAMMENFASSUNG	60
6. LITERATURVERZEICHNIS	63

1. EINLEITUNG

Um die biochemischen Vorgänge in der lebenden Zelle unter physiologischen Bedingungen, d. h. ohne Anwendung von Hemmstoffen, zu studieren, wird in der Genetik vorwiegend mit konditionellen Mutanten gearbeitet. Darunter versteht man solche, die sich unter bestimmten (erlaubten) Bedingungen phänotypisch wie der Wildtyp verhalten, unter anderen (nicht erlaubten) jedoch nicht mehr zu wachsen vermögen. Viele mögliche physiologische Zustände können in bestimmten Variationen für entsprechende Mutanten letal sein. So sind z. B. von Campbell (1961) konditionelle Mutanten des Phagen λ isoliert worden, die sich nur in bestimmten Wirtsbakterien vermehren können, sogenannte "host-defective" Mutanten. Außerdem isolierte dieser Autor Mutanten, welche nur bei einem bestimmten p_H -Wert sensitiv waren und andere, die bei hoher Temperatur nicht mehr wachsen konnten. Da die Temperatur eine leicht zu verändernde Bedingung darstellt, sind solche "temperatursensiblen" Mutanten (meist sensibel bei erhöhter Temperatur) die am meisten verwendeten Objekte für biochemische Untersuchungen. In der umfangreichen Literatur über temperatursensible Mutanten sind Arbeiten über niedere und höhere Organismen, von Phagen, Bakterien, über Pilze bis zu menschlichen Zellen enthalten. Auch die Funktionen, die sich als temperatursensibel herausstellten, weisen eine große Vielfalt auf, u. a. wurden Defekte in DNS-, RNS-, Proteinsynthese, Membranpermeabilität und Zellteilung untersucht (Bazill und Karamata, 1972; Beyersmann et al., 1971; Hereford und

Hartwell, 1971; Hutchison et al., 1969; Jeggo et al, 1973; Naha, 1973; Warner und Udem, 1972).

Prinzipiell ist es möglich, temperatursensible Mutanten für jedes Gen zu isolieren, das ein Protein codiert. Um die Prozesse zu untersuchen, welche die Synthese der Makromoleküle kontrollieren, sind konditionelle Mutanten eine wertvolle Hilfe. Zahlreiche Arbeiten mit diesem Ziel wurden an Bakterien durchgeführt und wertvolle Erkenntnisse gewonnen, wie beispielsweise die Notwendigkeit kontinuierlicher Proteinsynthese für Initiation der DNS-Synthese (Hirota et al., 1970), oder die Bindung der RNS-Polymerase an das Template (Khesin, et al, 1969). Auch Literatur über Untersuchungen der Makromolekülsynthese bei Eukaryonten mit Hilfe von temperatursensiblen Mutanten wurde, wenn auch nicht in so großem Umfang, veröffentlicht. Von Hartwell und Mitarbeitern (1967) beispielsweise wurden ts^- -Mutanten der Hefe isoliert, die auch auf Vollmedium bei unerlaubter Temperatur nicht zu wachsen vermögen. Solche Mutanten weisen Defekte in indispensable Genen auf; sie vermögen unter nicht erlaubten Bedingungen größere nicht supplementierbare Moleküle nicht mehr zu synthetisieren. Unter ihnen zeigen nur wenige Prozent temperatursensible RNS-, DNS- oder Proteinsynthese und eignen sich somit für Untersuchungen der Synthese und Regulation dieser Makromoleküle.

In der vorliegenden Arbeit wurden nach Ausarbeitung einer geeigneten Methode temperatursensible, indispensable Mutanten von *Neurospora crassa* isoliert. Dieser eukaryotische Organismus eignet sich besonders gut für physiologische Untersuchungen, da er schnell wächst, sich leicht

aufschließen läßt und genetisch gut untersucht ist. Jede Mutante mit temperatursensibler Transkription, Replikation oder Translation wäre interessant für die Untersuchung von Fragen nach Regulation und Kontrolle der Genwirkung bei Eukaryonten. Um solche Mutanten zu finden, wurden daher Protein-, RNS- und DNS-Synthese der gewonnenen Mutanten geprüft. Eine Mutante konnte genauer charakterisiert werden; sie weist bei unerlaubter Temperatur einen primären Defekt der Transkription auf, der Sekundärwirkungen auf Translation und Replikation nach sich zieht.

2. ERGEBNISSE

2.1. Isolierung und teilweise Charakterisierung induzierter temperatursensibler Mutanten bei *Neurospora crassa*

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst temperatursensible Mutanten von *Neurospora crassa* isoliert. Hierfür war die Ausarbeitung einer geeigneten Methode erforderlich, um derartige Mutanten direkt selektieren zu können. Die isolierten Mutanten wurden soweit charakterisiert, daß solche mit dem Verlust einer entbehrlichen Funktion, defektem Keimungsvorgang und irreversiblen Schäden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden konnten.

2.1.1. Anwendung der Stempelmethode bei *Neurospora crassa*

Als sehr geeignet, eine große Anzahl an Mutanten zu isolieren, hat sich bei Bakterien und Hefen die sogenannte Stempelmethode erwiesen. Sie wurde für die beabsichtigten Untersuchungen soweit modifiziert, daß sie für *Neurospora crassa* angewendet werden konnte. Da der Wildtyp von *Neurospora crassa* sich sehr schnell über das ihm zur Verfügung stehende Medium ausbreitet, ist eine für die Anwendung der Stempelmethode notwendige Abgrenzung einzelner aus einer Konidie entstandener Kolonien nicht möglich. Es wurde daher ein kolonieförmig wachsender Stamm, col-25, von *Neurospora crassa* verwendet, der kompakte Einzelkolonien von einigen Millimetern Durchmesser bildet.

Es handelt sich bei diesem Stamm, der von KØLMARK, H. G., Institut für Phys. Botanik, Uppsala, zur Verfügung gestellt wurde, um eine Morphologiemutante. Sie entstand als Folge mehrerer Mutationsschritte und hat neben dem kolonieförmigen Wachstum noch einen weiteren Vorteil. Der Stamm bildet Mikrokonidien. In ihnen ist im Gegensatz zu den 2 - 3 kernigen Makrokonidien des Wildtyps nur vorwiegend ein Kern pro Koni-

die enthalten (Kölmark und Kilbey, 1968). Dies begünstigt die Segregation rezessiver Mutationen. Da die gesuchten temperatursensiblen Mutanten spontan nur mit sehr geringer Häufigkeit auftreten, wurden auf chemischem Wege mit 1-Nitroso-3nitro-1 methylguanidin (Nitrosoguanidin) Mutationen induziert. Temperatursensible, indispensable Mutanten traten unter den angewandten Versuchsbedingungen mit einer Häufigkeit von $3 \cdot 10^{-3}$ auf. Waren die mit dem Mutagen behandelten Konidien auf Agar-Platten zu Kolonien ausgewachsen, so konnten charakteristische Koloniemuster mit Hilfe eines mit Samt überzogenen Stempels in Form von Konidien übertragen werden (Abb. 1).

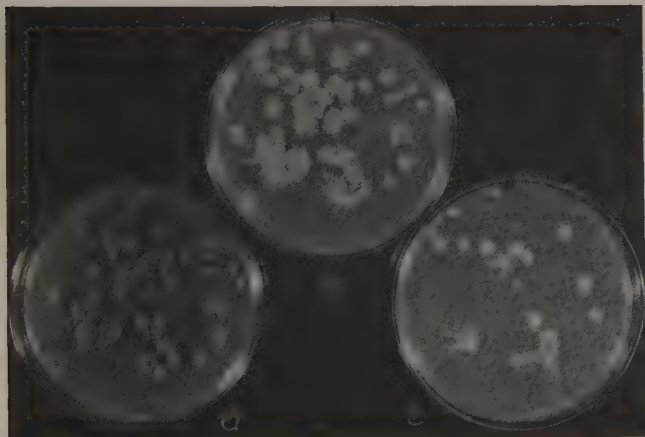


Abb. 1 :

- (a) - Ein Gemisch aus dem ts^+ -Stamm col-25 und col $^-$, ts^- -Mutantenkolonien auf Vollmedium.
- (b) - Das von (a) erneut auf Vollmedium gestempelte und bei 25°C gewachsene Koloniemuster.
- (c) - Das von (a) auf Vollmedium gestempelte und bei 37°C gewachsene Koloniemuster. Die Kolonieabdrücke von ts^- -Mutanten sind nicht oder nur sehr schwach weitergewachsen.

Analog der Übertragung von Zellen einer Kolonie bei Bakterien und Hefen erwies sich die Stempelmethode auch für *Neurospora crassa* als erfolgreich. Kolonienabdrücke, die bei 25°C, nicht jedoch bei 37°C weiter wuchsen, wurden als temperatursensibel isoliert.

2.1.2 Eigenschaften der Mutanten

Für die vorliegende Arbeit interessant waren Mutanten, deren Temperatursensibilität im Verlust einer indispensable, d. h. unentbehrlichen Funktion bestand. Der Defekt solcher Mutanten kann im Gegensatz zu den dispensablen Mutanten, bei denen die Synthese kleiner, meist supplementierbarer Moleküle wie z. B. Aminosäuren, Vitaminen, Purinen oder Pyrimidinen gestört ist, nicht durch geeignetes Medium ausgeglichen werden. Unter ihnen müßten die gesuchten Mutanten mit gehemmter Translation, Replikation und Transkription zu suchen sein.

Es wurden folglich nur Mutanten weiter untersucht, die sowohl auf Voll- wie auch auf Minimalmedium bei 25°C, nicht jedoch bei 37°C wachsen konnten.

Die Zuordnung der Mutanten aufgrund ihres Wachstums auf Voll- oder Minimalmedium, sowie bei erlaubter und unerlaubter Temperatur zu 5 unterschiedlichen Gruppen zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 1:

Kolonie Typ	Vollmedium		Minimalmedium	
	25° C	37° C	25° C	37° C
1	+	+	+	+
2	+	-	+	-
3	+	+	-	-
4	+	-	-	-
5	+	+	+	-

Auftretende Kolonietypen:

- 1 : Wildtyp bezüglich Auxotrophie und
Temperatursensibilität
- 2 : ts^- , indispensabel
- 3 : auxotroph
- 4 : Doppelmutante: auxotroph und ts^- ,
indispensabel
- 5 : ts^- , dispensabel

Unter den isolierten Mutanten konnten sich auch solche mit temperatursensiblen Funktionen des Keimungsvorganges befinden. Um sie zu erkennen und von weiteren, die Protein-, RNS- und DNS-Synthese betreffenden Untersuchungen auszuschalten, wurde folgender (in Tabelle 2 veranschaulichter) Versuch durchgeführt.

Tabelle 2:

Mutante Nr.	I			II		
	a	b	c	a	b	c
2	+	(+)		+	(+)	+
3	+	-	+	+	-	+
6	+	-	(+)	+	-	(+)
7	+	-	(+)	+	-	
11	+	-	-	+	-	-
12	+	-	(+)	+	-	+
13	+	-	+	+	-	+
14	+	-	-	+	-	-
18	+	-	(+)	+	-	(+)
20	+	-	-	+	-	-
21	+	-	-	+	-	(+)
22	+	-	(+)	+	-	(+)
24	+	-	+	+	-	+
26	+	-	-	+	-	-
30	+	-	+	+	-	+
32	+	(+)	+	+	(+)	+
34	+	-	+	+	(+)	+
35	+	-	(+)	+	-	(+)
36	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)
37	+	(+)	(+)	+	-	(+)
38	+	-	(+)	+	-	(+)
39	+	-	-	+	-	-
40	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)
42	+	-		+	-	
43	+	-	(+)	+	-	(+)
45	+	-	+	+	(+)	+
46	+	-		+	(+)	
47	+	-	-	+	-	-

Tabelle 2 :

Charakterisierung der Mutanten aufgrund ihres Wachstums bei erlaubter (a) und unerlaubter (b) Temperatur, vor (I) und nach (II) Ankeimen der Konidien.

Nachdem die Zellen 10 Tage lang bei 37° C bebrütet worden waren, wurde nochmals ihr Wachstum bei 25° C geprüft (c).

Mutanten mit temperatursensiblen Defekt des Keimungsvorganges sollten nach bei erlaubter Temperatur erfolgter Keimung auch unter den Bedingungen der unerlaubten Temperatur normal weiterwachsen können. Es wurden daher Konidiensuspensionen der Mutanten zur Keimung gebracht, anschließend zwei Proben auf GC-Agar plattiert, und die eine bei 25° C, die andere bei 37° C bebrütet. Das Wachstum bei beiden Temperaturen sollte bei Mutanten, deren Temperatursensibilität den Keimungsvorgang betrifft, gleich sein. Dies war bei drei Mutanten (Nr. 34, 45, 46) der Fall, die von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden.

Temperatursensible Mutanten mit primärem Defekt der Replikation, Transkription oder Translation sind für weitere Untersuchungen nur interessant, wenn der bei unerlaubter Temperatur entstandene Ausfall reversibel ist.

Um Mutanten mit irreversiblen und sekundären Schäden zu erkennen, wurden Konidien 10 Tage lang bei 37° C und anschließend wieder bei 25° C bebrütet (Tabelle 2).

Etwa 25 % aller mutierten Konidien konnten nicht mehr zu Kolonien auswachsen (Nr. 11,14,20,21,26,39,47) und wurden nicht weiter untersucht.

2.2. Messung von Einbaukinetiken bei der Proteinsynthese

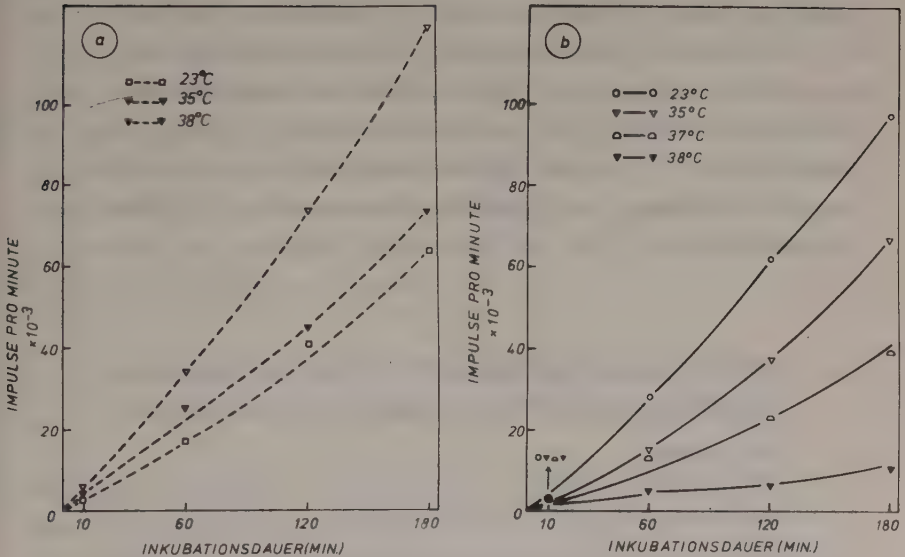
Temperatursensible Mutanten mit defekter Translation sollten an der Hemmung der Proteinsynthese bei unerlaubter Temperatur erkennbar sein. Im folgenden Kapitel werden Versuche beschrieben, die Einbaukinetiken markierter Aminosäuren in Zellproteine benutzen, um festzustellen, ob sich die Proteinsynthese der untersuchten Mutanten bei unerlaubter Temperatur qualitativ von derjenigen bei erlaubter Temperatur unterscheidet. Die Markierungsmethoden, mit denen Hartwell (1967) die Proteinsynthese temperatursensibler Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* untersuchte, wurden dazu für *Neurospora crassa* modifiziert.

Es wurden Zellsuspensionen mit markiertem Leucin inkubiert, nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten Proben entnommen und die Radioaktivität der Zellproteine in Impulsen pro Minute bestimmt.

2.2.1. Kinetik des Einbaues markierten Leucins in Zellen des ts^+ -Stammes bei verschiedenen Temperaturen

Eine Suspension von Konidien des ts^+ -Stammes in Minimalmedium wurde etwa 17 Stunden lang bei 23° C belüftet, bis die Konidien angewachsen waren. Anschließend wurde die Suspension geteilt und bei 23° C, 35° C und 38° C weiterbelüftet. Nach drei Minuten waren die gewünschten höheren Temperaturen in den Suspensionen erreicht und das radioaktive Leucin wurde zugegeben. Nach Inkubationszeiten von

10 bis 180 Minuten wurden Proben gleicher Zellmengen entnommen. Das nicht in Zellprotein inkorporierte Leucin wurde ausgewaschen und die Radioaktivität der Proben bestimmt. Die Impulse pro Minute wurden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgetragen (Fig. 1 a).



Figur 1

Einbau radioaktiv markierten Leucins in die Proteine

a: des Stammes *col*⁻, *ts*⁺

b: der *ts*⁻-Mutante 30, *col*⁻, *ts*⁻

bei verschiedenen Temperaturen.

Die Rate des Einbaues markierten Leucins nimmt in allen Ansätzen während der gesamten Versuchsdauer geringfügig zu. Bei 35°C wächst im Vergleich zu 25°C die Inkorpora-

tion pro Zeiteinheit aufgrund des beschleunigten Stoffwechsels bei der höheren Temperatur. Auch bei 38° C ist noch eine Steigerung der Einbaurate des markierten Leucins gegenüber derjenigen bei 23° C zu verzeichnen, jedoch eine vergleichsweise Verringerung zu 35° C. Offensichtlich ist das Temperaturoptimum zumindest eines der an der Proteinsynthese beteiligten Komponenten bereits überschritten. Für die folgenden Untersuchungen an temperatursensiblen Mutanten wurde deshalb eine niedrigere Temperatur (37 ° C) gewählt, um gute Vergleichsmöglichkeiten zum Wildtyp bezüglich der Temperatursensibilität zu gewährleisten.

2.2.2 Einbau markierten Leucins in Zellen der temperatursensiblen Mutanten bei erlaubter und unerlaubter Temperatur

Auch die Mutanten wurden nun auf gleiche Weise untersucht. Es zeigte sich, daß mit einer Ausnahme (Mutante 30) die Zellen aller Mutanten ebenso wie der Wildtyp bei 37° C mehr markiertes Leucin in ihr Protein einbauten als bei 25° C. Die Proteinsynthese der Zellen dieser Mutanten wurde demzufolge zumindest für die Dauer von 180 Minuten nach Erreichen der höheren Temperatur nicht gehemmt. Der temperatursensible Defekt dieser Mutanten beeinflusst daher nicht die Translation. Nicht auszuschließen hingegen ist ein Defekt, der in der Zellteilung oder der Zell-

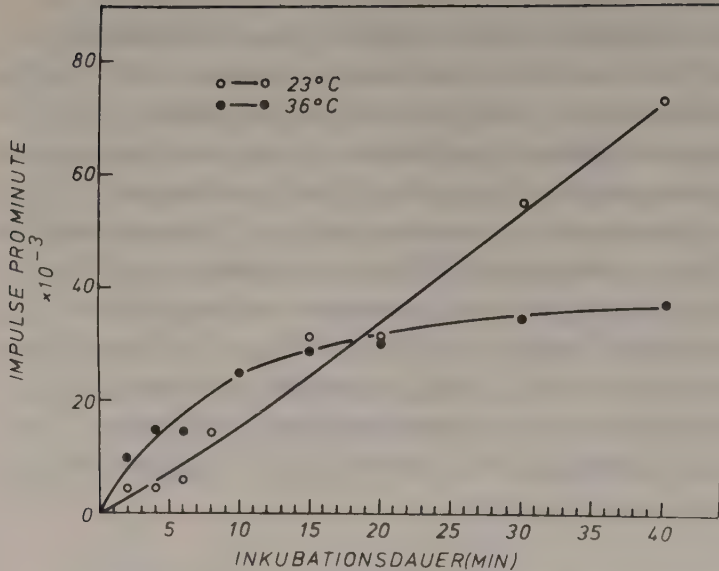
wandbildung liegen könnte. Solche Mutanten sollten bei unerlaubter Temperatur in den ersten Stunden unbeeinflusste DNS-, RNS- und Proteinsynthese zeigen (Hartwell 1967).

Mutanten dieser Art wurden nicht weiter untersucht.

Die Inkorporationskinetik markierten Leucins der oben als Ausnahme bezeichneten Mutante Nr. 30 unterschied sich sehr stark von denen der anderen. Wie Figur 1b zeigt, ist im Vergleich zum Wildtyp ts^+ (Fig. 1 a) schon bei $35^{\circ}C$ eine starke Hemmung der Proteinsynthese zu verzeichnen. Steigert man die Temperatur bis auf $38^{\circ}C$, so ist nach 3 Stunden nur noch eine geringe Restsynthese vorhanden. Die Mutante weist somit offensichtlich bei unerlaubter Temperatur verminderte Proteinsynthese auf. Sie wird im Folgenden genauer untersucht.

2.2.3. Kinetik des Beginns der Hemmung der ts^- -Mutante Nr. 30 nach Überführung in unerlaubte Temperatur

Nach Untersuchungen von Hartwell (1967) an Hefe ist es möglich, daß bei Mutanten mit einem Defekt in einem der gemessenen Parameter (Protein-, RNS- oder DNS-Synthese) dieser Defekt nur indirekt etwas mit dem gehemmten Prozess zu tun hat. Es kann also auch bei der hier untersuchten Mutante die Hemmung der Proteinsynthese als sekundärer Effekt auftreten. Da die Abstände der Messpunkte in Fig. 1b zu groß sind, um den Beginn der Hemmung lokalisieren zu können, mußten die ersten Minuten genauer charakterisiert werden. Daraus dürfte sich ein Hinweis ergeben, ob primär die Proteinsynthese Ursache der Temperatursensibilität ist. Wie in Fig. 2 dargestellt, wurden vom Beginn der Inkubation alle 2 Minuten Proben entnommen



Figur 2

Einbau radioaktiv markierten Leucins in die Proteine der temperatursensiblen Mutante 30 bei erlaubter und unerlaubter Temperatur.

und die inkorporierte Radioaktivität gemessen. Es zeigt sich, daß in den ersten Minuten nach Erreichen der unerlaubten Temperatur die Proteinsynthese zunächst beschleunigt verläuft und Hemmung erst nach etwa 10 Minuten einsetzt. Bei allen denkbaren Ursachen für primäre Proteinsynthese-Hemmung hingegen tritt diese nach kürzerer Zeit ein:

- a) Blockierung der Verlängerung der Peptidketten bei erreichter höherer Temperatur.
- b) Defekt der Initiation neuer Polypeptidketten. Die Kinetik des Leucineinbaus ergibt dann, daß die Proteinsynthese nach 1 - 3 Minuten gehemmt wird (Hartwell und Mc Laughlin, 1969).
- c) Temperatursensibilität der Bereitstellung von Aminoacyl - tRNS. Dann tritt ebenfalls bereits nach 1 - 3 Minuten Hemmung ein (Reiniger, G., persönl. Mitteilungen).

Der genetisch bedingte temperaturempfindliche Defekt betrifft sie folglich erst sekundär. Seine Lokalisation ist daher in der RNS- oder DNS-Synthese zu vermuten.

2.3. Einbaukinetiken der RNS- und DNS-Synthese

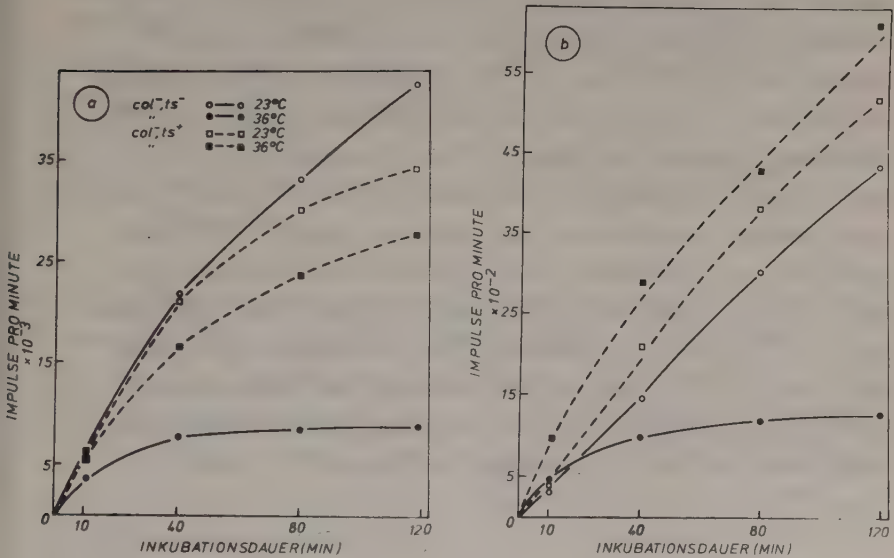
Am besten untersucht sind RNS- und DNS-Synthese bei Prokaryonten. Bei diesen Organismen läßt sich die RNS mit Uridin und die DNS mit Thymidin markieren. Eine solche spezifische Markierung der DNS beispielsweise ist bei Eukaryonten nicht ohne weiteres möglich. So besitzen unter anderem *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* keine Thymidinkinase, die erforderlich ist, um die Phosphorylierung von Thymidin zu T-5'-phosphat in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} zu katalysieren (Grivell und Jackson, 1968). Verschiedene Forscher (z. B. Hartwell) haben des-

halb mit markiertem Adenin gearbeitet, das in RNS und DNS inkorporiert wird. Adenin gehört allerdings zu den Purinen und nach Wood und Luck (1969) werden Pyrimidine schneller inkorporiert als Purine. Nun wandelt *Neurospora crassa* Uracil sehr schnell in alle anderen Pyrimidine um, so daß DNS nach Zugabe von radioaktiv markiertem Uridin zu *Neurospora*-Zellen ebenfalls eine Markierung aufweist. Nach Fridland (1973) ist in eukaryotischen Zellen die Inkorporationsrate markierten Desoxy-Uridins (dUrd) in säureunlösliches Material doppelt so groß wie diejenige markierten Desoxy-Thymidins (dThd); unter Umwandlung von dUrd entstandenes dTTP wird schneller in die DNS inkorporiert. Als Erklärungsmöglichkeit wird diskutiert, daß die Enzyme des "de novo pathways" demjenigen Pool näher sein könnten, der für die DNS-Synthese benutzt wird.

2.3.1. Einbau markierten Uridins in die RNS von col^- , ts^+ und col^- , $ts^-(30)$ bei erlaubter und unerlaubter Temperatur

In den folgenden Experimenten wurden RNS- und DNS-Synthese untersucht, und zwar durch Inkorporation radioaktiv markierten Uridins in RNS und Einbau des Umwandlungsproduktes des markierten Uridins in DNS. Die miteinander verglichenen RNS- und DNS-Synthesen gehörten demselben Einbauversuch an: Konidiesuspensionen von "col" und "30" wurden 16 bis 18 Stunden lang belüftet, bis die Konidien angekeimt waren. Dann wurden die Suspensionen geteilt und jeweils die eine

Hälfte bei erlaubter Temperatur, die andere bei unerlaubter Temperatur weiterbelüftet. Schon nach drei Minuten war die höhere Temperatur erreicht und das radioaktive Uridin wurde hinzugegeben.



Figur 3

Kinetik des Einbaus von radioaktivem Uridin bzw. dessen Umwandlungsproduktes in

a: die RNS

b: die DNS

des Stammes col^{-}, ts^{+} und der Mutante 30, col^{-}, ts^{-} bei erlaubter und unerlaubter Temperatur. RNS- und DNS-Synthese wurden in demselben Versuch gemessen.

Die Einbaukurven des Uridins in die RNS (Fig. 3a) sind für Wildtyp und ts^- -Mutante bei normaler Temperatur bis 40 Minuten nach Beginn der Inkubation identisch. Sie beweisen linear mit der Zeit zunehmende Menge eingebauten Uridins. Bei der unerlaubten Temperatur von 36°C hingegen ist auch im 40 Minuten-Intervall die Kurve nicht mehr linear: Mit zunehmender Inkubationsdauer nimmt die Einbaurrate ab. Das Ausmaß der Abnahme erreicht für die ts^- -Mutante den 19-fachen Wert des Wildtyps ts^+ . Die Hemmung der RNS-Synthese der Mutante ist somit von Inkubationsbeginn an feststellbar. Sie nimmt während der ersten 40 Minuten ständig zu, um am Ende dieser Zeitdauer den Maximalwert zu erreichen. Dieses wird dadurch beschrieben, daß die Steigung der Kurve zwischen 40 und 120 Minuten nur noch etwa 6 % derjenigen bei 23°C beträgt. Wie schon festgestellt zeigt auch der Stamm col^- , ts^+ bei 36°C zwischen 10 und 40 Minuten eine, wenn auch wesentlich geringere, Erniedrigung der Syntheserate. Danach tritt jedoch offenbar Gewöhnung an die veränderte Temperatur ein und die Steigung der Kurve ist gleich der bei 23°C .

2.3.2. Kinetik der DNS-Synthese vom Stamm col^- , ts^+ und col^- , $ts^-(30)$ bei erlaubter und unerlaubter Temperatur

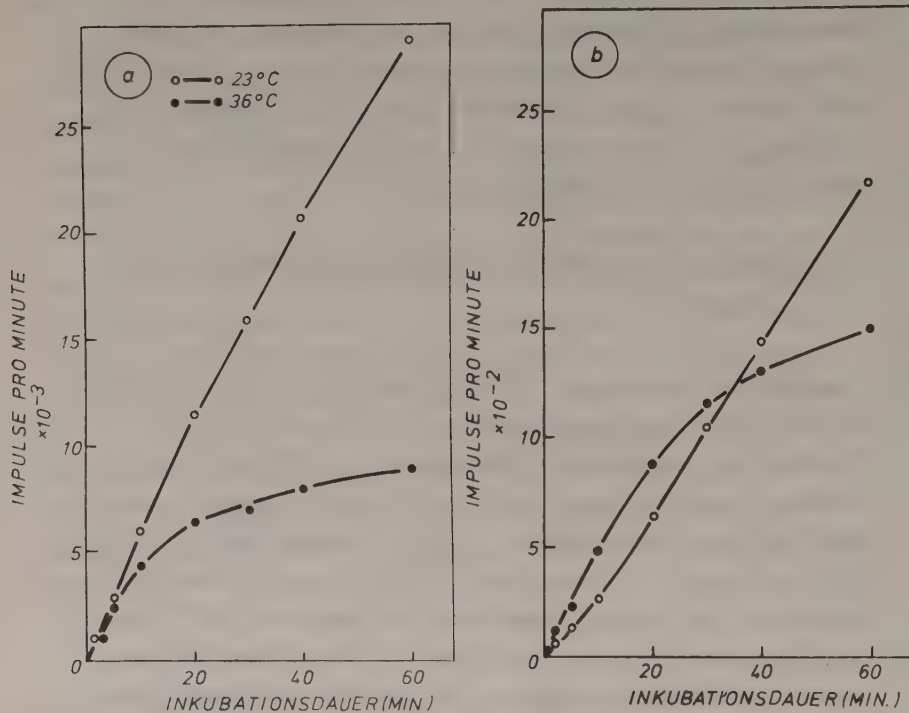
Wie in dem Kapitel Material und Methoden ausgeführt, wurden zur Bestimmung der DNS aus demselben Experiment, wie oben für die RNS-Synthese beschrieben, Proben entnommen.

Die RNS wurde hydrolysiert und das säureunlösliche Material anschließend gefällt und filtriert. Die Einbaukurven bei der DNS-Synthese für $\text{col}^- \text{ts}^+$ und die ts^- -Mutante 30 bei 23°C und 36°C zeigt Fig. 3 b. Die DNS-Synthese des Wildtyps ist bei beiden Temperaturen annähernd gleich (gleiche Steigung der Geraden). Bei der temperatursensiblen Mutante hingegen beginnt bei unerlaubter Temperatur nach 10 Minuten eine starke Hemmung. Die Steigung der Kurve zwischen 80 und 120 Minuten beträgt weniger als 10 % derjenigen bei 23°C .

2.3.3. Beginn der Hemmung der RNS- und DNS-Synthese der Mutante 30

Aus den vorangegangenen Experimenten konnte zwar entnommen werden, daß eine Hemmung sowohl der RNS, als auch der DNS-Synthese bei unerlaubter Temperatur stattfindet. Wann diese Hemmung jedoch einsetzt und ob für beide Synthesen zum gleichen Zeitpunkt blieb offen. Um eine Aussage darüber zu machen, mußten die Einbaukurven in den ersten Minuten nach Erreichen der höheren Temperatur im Vergleich zur erlaubten Temperatur untersucht werden. Es wurde wiederum der Einbau markierten Uridins in RNS und dessen Umwandlungsprodukt in DNS in demselben Experiment bestimmt. Wie der Uridineinbau in die RNS (Fig. 4a) verdeutlicht, setzt die Hemmung der RNS-Synthese bei 36°C schon nach etwa 2 Minuten ein. Für die DNS-Synthese (Fig. 4b) jedoch ergibt sich in den ersten Minuten eine signifikante Beschleunigung der Synthese bei unerlaubter Temperatur. Der Beginn der Hemmung setzt erst nach etwa 20 Minuten ein. Die RNS-Syn-

these wird somit lange vor der DNS-Synthese gehemmt. Die Hemmung der Proteinsynthese beginnt ebenfalls nach zuvor stattgefundenener Steigerung der Einbaurrate erst später.



Figur 4

Kinetik des Einbaus von radioaktivem Uridin in

a: die RNS

und dessen Umwandlungsproduktes in

b: die DNS

der temperatursensiblen Mutante 30 bei erlaubter und unerlaubter Temperatur.

Durch diese Stimulierung in den ersten Minuten sowohl der Protein- als auch der DNS-Synthese kann auch ein nicht spezifischer Verlust wie Änderung der Membranpermeabilität oder Defekt im Energiemetabolismus als mögliche Ursache für die Temperatursensibilität ausgeschlossen werden. Dieser sollte alle Synthesen gleichermaßen betreffen und nicht in den ersten Minuten die RNS-Synthese hemmen, DNS und Proteinsynthese dagegen stimulieren. Änderung der Membranpermeabilität müßte sich zumindest auf RNS- und DNS-Synthese gleich auswirken, da die Radioaktivität beider Makromoleküle von demselben exogen hinzugefügten Uridin stammt.

2.4. Untersuchung der Reaktion der Mutante auf Rifampicin

Unter Benutzung eines Antibiotikums, das spezifisch die Transkription hemmt, läßt sich ein Modellversuch durchführen, in dem

- a) die Kinetik einer direkten RNS-Synthese-Hemmung studiert und
- b) die sekundären Wirkungen auf Protein- und DNS-Synthese nach Unterbrechung der RNS-Synthese beobachtet werden können.

Der Vergleich der Ergebnisse des Modellversuchs mit denen, die an der ts^- -Mutante bei unerlaubter Temperatur gewonnen werden, zeigt dann:

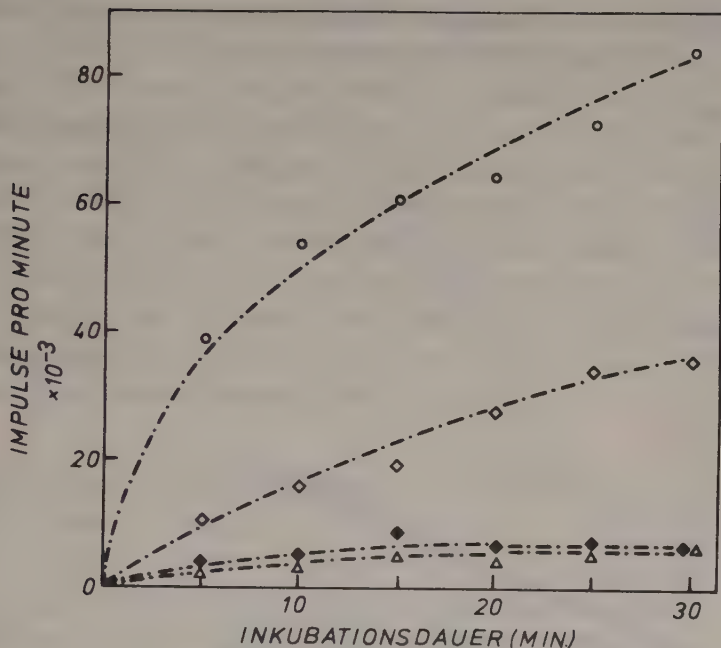
- 1.) ob es sich um gleiche primäre oder sekundäre Änderungen handelt, oder
- 2.) ob die temperatursensible Mutation eventuell pleiotrop ist, d. h. auf Nucleinsäure und Proteinsynthese (und andere Funktionen) gleichzeitig hemmend wirkt.

Ein bei Bakterien häufig angewandter und sehr effektiver Hemmstoff ist Rifampicin. Dieses Antibiotikum hemmt die Initiation der Transkription, indem es mit der RNS-Polymerase reagiert (Pato und von Meyenburg, 1970). Wahrscheinlich hemmt es kompetitiv die Bindung des ersten Nucleotids an die RNS-Polymerase, vielleicht durch Bindung an denselben Wirkort (Mauro et al., 1969). Untersuchungen über die Wirkung von Rifampicin auf *Neurospora crassa* wurden von Barath und Küntzel (1972) durchgeführt. Die Autoren legen keine experimentellen Daten vor, welche die Hemmung der Kern-RNS-Polymerase ausschließen. In dieser Arbeit zeigen eigene Vorversuche mit möglicherweise anders präpariertem Rifampicin, daß bei *Neurospora crassa* durch diesen Hemmstoff auch die Transkription im Zellkern gehemmt wird.

2.4.1. Wirkung des Rifampicins auf die allgemeine RNS-Synthese des Wildtyps (col^+ , ts^+) von *Neurospora crassa*

Um herauszufinden, ob Rifampicin nur die mitochondriale, oder auch die Kern-RNS-Polymerase blockiert, wurden Suspensionen des Wildtyps, col^+ts^+ , mit Rifampicin verschiedener Konzentrationen inkubiert. Sollte sich die Wirkung des Antibiotikums auf die mitochondriale RNS-Synthese beschränken, so dürfte die Hemmung nur wenige Prozent der gesamten RNS-Synthese betragen. Wie aus den Kurvenneigungen in Fig. 5 hervorgeht, kann bei *Neurospora crassa* die Transkription offensichtlich auch im Zellkern durch

Rifampicin gehemmt werden. Schon bei einer Konzentration des Antibiotikums von $10 \mu\text{g/ml}$ ist deutliche Hemmung der RNS-Synthese sichtbar; bei 50 und $100 \mu\text{g/ml}$ beträgt die Synthese nur noch wenige Prozent derjenigen ohne Rifampicin.



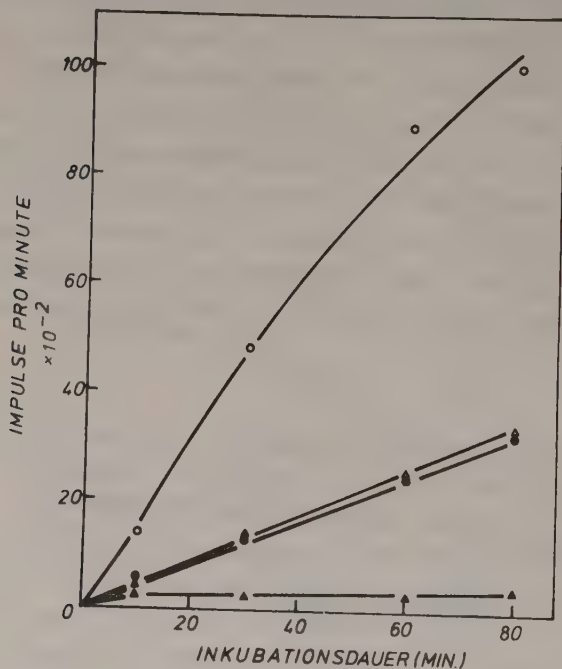
Figur 5

Kinetik des Einbaus von radioaktivem Uridin in die RNS des Wildtyps col^+ , ts^+ bei Inkubation mit Rifampicin verschiedener Konzentrationen.

- Kontrolle
- ◇---◇ $10 \mu\text{g/ml}$ Rifampicin
- ◆---◆ $50 \mu\text{g/ml}$ Rifampicin
- △---△ $100 \mu\text{g/ml}$ Rifampicin

2.4.2. Kinetik der RNS-Synthese der ts^- -Mutante mit und ohne Rifampicin

Mit gleicher Versuchstechnik wurde die Wirkung des Rifampicin mit derjenigen verglichen, welche die unerlaubte Temperatur auf die ts^- -Mutante 30 hervorruft. Dazu wurde



Figur 6

Kinetik des Einbaus von radioaktivem Uridin in die RNS der ts^- -Mutante 30 bei Inkubation ohne und mit Rifampicin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$), sowie erlaubter und unerlaubter Temperatur:

- ——— ○ 23° C, ohne Rifampicin
- ——— ● 36° C, ohne Rifampicin
- △ ——— △ 23° C, mit Rifampicin
- ▲ ——— ▲ 36° C, mit Rifampicin

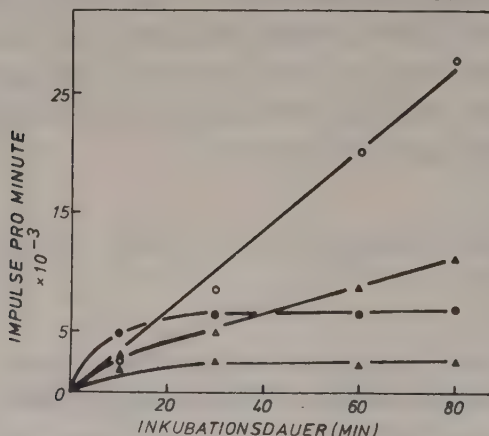
die RNS-Synthese zunächst durch Einbau markierten Uridins bei 23° C und 36° C jeweils ohne und mit 100 µg/ml Rifampicin-Inkubation untersucht. Aus den Hemmkurven (Fig. 6) des kolonieförmig wachsenden Stammes geht deutlich hervor, daß bei erlaubter Temperatur die Transkription der ts^- -Mutante 30 durch Rifampicin gehemmt wird. Die Kurvenverläufe bei Hemmung durch das Antibiotikum oder durch unerlaubte Temperatur zeigen große Ähnlichkeit. Sie stehen in Übereinstimmung mit der Annahme, daß in beiden Fällen die gleiche Ursache, nämlich eine Blockierung der Transkription, für die Einbauhemmung verantwortlich ist. Bei Inkubation der Mutante mit Rifampicin bei unerlaubter Temperatur ist so gut wie keine RNS-Synthese mehr zu verzeichnen: beide Hemmungen sind additiv.

2.4.3. Kinetik der DNS-Synthese der ts^- -Mutante mit und ohne Rifampicin

Im folgenden Experiment wurde untersucht, wie sich eine Inkubation mit Rifampicin auf die DNS-Synthese auswirkt. Da oben bewiesen wurde (Kapitel 2.4.1.), daß dieses Antibiotikum auch bei *Neurospora crassa* die Transkription hemmt, sollte daraus ersichtlich werden, wie schnell sich bei der ts^- -Mutante "30" eine Hemmung der RNS-Synthese auch auf die DNS-Synthese auswirkt. Die Wirkung des Hemmstoffes sollte mit derjenigen der höheren Temperatur verglichen werden.

Die Kurven (Fig. 7) zeigen, daß bei der temperatursensiblen Mutante Inkubation mit Rifampicin bei 23° C einen ähnlichen Effekt auf die DNS-Synthese ausübt wie Inkubation ohne Rifampicin bei 36° C. Dies steht in Übereinstimmung mit Fig. 4b. Bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Antibiotikum bei unerlaubter Temperatur schließlich ist die DNS-Synthese fast völlig gehemmt.

Unter den von G. Grosch benutzten Versuchsbedingungen ist 10 - 15 Minuten nach Zugabe des Rifampicin weder DNS- und Proteinsynthese, noch aktiver Zuckertransport signifikant gehemmt (G. Grosch, persönl. Mitteilungen).



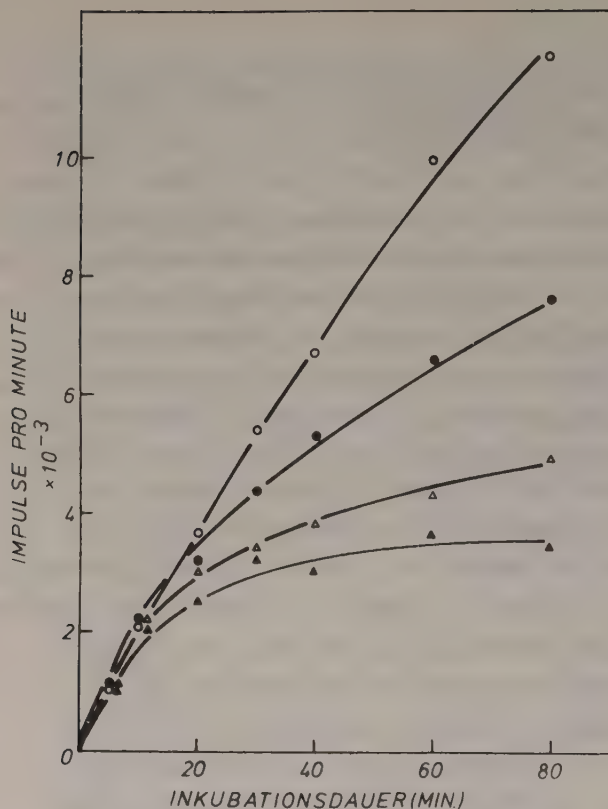
Figur 7

Einbau des Umwandlungsproduktes von radioaktivem Uridin in die DNS der ts^- -Mutante 30 bei Inkubation ohne und mit Rifampicin (100 μ /ml), sowie bei erlaubter und unerlaubter Temperatur:

- | | |
|-------|------------------------|
| ○ — ○ | 23° C, ohne Rifampicin |
| ● — ● | 36° C, ohne Rifampicin |
| △ — △ | 23° C, mit Rifampicin |
| ▲ — ▲ | 36° C, mit Rifampicin |

2.4.4. Kinetik der Proteinsynthese der Mutante "30" bei Inkubation mit Rifampicin

Um die Frage zu beantworten, wie schnell sich bei *Neurospora crassa* eine Hemmung der Transkription auf die Translation auswirkt, wurde die Wirkung des Rifampicins auf die Proteinsynthese untersucht. In Zellsuspensionen ohne und mit Rifampicin wurde dazu wiederum markiertes Leucin jeweils bei erlaubter und unerlaubter Temperatur eingebaut. Wie aus den Kurven (Fig. 8) hervorgeht, wirkt sich der Hemmstoff nicht wie bei der RNS-Synthese sofort auf die Proteinsynthese aus. Ähnlich wie die DNS-Synthese beginnt die Hemmung der Proteinsynthese signifikant erst nach 10-15 Minuten. Die Hemmung bei unerlaubter Temperatur tritt nach der gleichen Zeit ein. Auch die Proteinsynthese zeigt ebenso wie die DNS-Synthese bei 36° C eine gesteigerte Syntheserate in den ersten Minuten (siehe Fig. 2), bedingt durch den beschleunigten Stoffwechsel bei der höheren Temperatur. Zusammenfassend kann zur Wirkung des Rifampicins auf *Neurospora crassa* gesagt werden, daß auch bei Eukaryonten ebenso wie schon für Prokaryonten nachgewiesen, eine Hemmung der Transkription erfolgt. Wie für Prokaryonten an *E. coli* gezeigt wurde (Dennis und Bremer, 1973; Tocchini-Valentini et al., 1968) setzten die Hemmung der RNS-Synthese sofort und erst später auch die der Proteinsynthese ein. Bei der hier untersuchten temperatursensiblen Mutante wirkt sich die Inkubation bei unerlaubter Temperatur genauso auf die RNS-, DNS- und Proteinsynthese aus



Figur 8

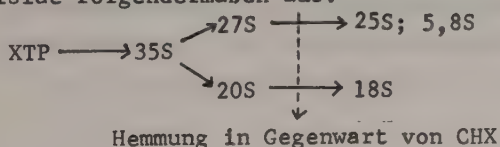
Kinetik des Einbaus von radioaktivem Leucin in die Proteine der ts^- -Mutante 30 bei Inkubation ohne und mit Rifampicin ($100 \mu\text{g/ml}$), sowie bei erlaubter und unerlaubter Temperatur:

- ——— ○ 23°C , ohne Rifampicin
- ——— ● 36°C , ohne Rifampicin
- △ ——— △ 23°C , mit Rifampicin
- ▲ ——— ▲ 36°C , mit Rifampicin

wie Behandlung mit Rifampicin. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß bei der ts^- -Mutante 30 primär eine Funktion des Transkriptionsprozesses temperatursensibel ist.

2.5. Untersuchung der Wirkung von Cycloheximid, CHX, auf die Mutante. "30"

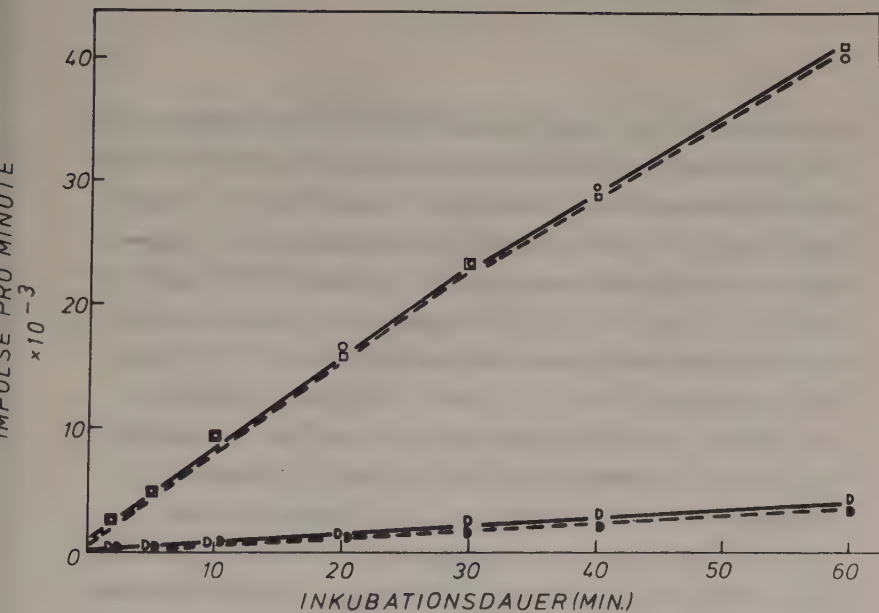
Ein weiterer Modellversuch mit Hilfe eines Antibiotikums wurde unternommen, um die Kinetik der RNS-Synthese bei primär gehemmter Proteinsynthese zu untersuchen. Der Zeitpunkt der RNS-Synthese-Hemmung unter Einwirkung eines solchen Hemmstoffes nach 10 bis 20 Minuten dient als weiterer Beweis für das Vorliegen eines bei der ts^- -Mutante primär die Transkription und nicht die Translation betreffenden Defektes. Im Vergleich zur Wirkung des Antibiotikums tritt die Hemmung der RNS-Synthese bei unerlaubter Temperatur schon nach zwei Minuten ein. Als Antibiotikum wurde CHX verwendet, das bei Eukaryonten beinahe vollständige Hemmung der Translation an cytoplasmatischen Ribosomen hervorruft. Die Hemmung der Proteinsynthese wirkt sich auch auf die RNS-Synthese aus, weil die Reifung der ribosomalen precursor RNS kontinuierliche Proteinsynthese erfordert. Das sieht nach Untersuchungen von Udem und Warner (1972) an *Saccharomyces cerevisiae* folgendermaßen aus:



XTP symbolisiert die vier möglichen Nucleosidtriphosphate, aus denen im Gegensatz zu Bakterien, welche ribosomale RNS direkt produzieren, von Hefen und anderen Eukaryonten (Taber und Vincent, 1969) zunächst "Precursor" - Moleküle gebildet werden (35 S). Aus Ihnen entstehen durch Abspaltung zunächst 27 S- und 20 S-RNS-Moleküle und durch weitere Abspaltung schließlich reife ribosomale RNS (18 S, 25 S). Die Hemmung der Proteinsynthese durch CHX bewirkt, daß noch einige Minuten lang Precursor"-Moleküle, aber keine reifen rRNS-Moleküle mehr gebildet werden; außerdem kommt es zur Akkumulation von mRNS (Hartwell et. al., 1970).

2.5.1. Kinetik der Proteinsynthese ohne und mit Hemmung durch CHX

Zunächst wurde untersucht, ob die Proteinsynthese des kolonieförmig wachsenden Stammes von *Neurospora crassa* in ähnlicher Weise durch CHX gehemmt wird, wie der Wildtyp, col^+ , ts^+ . Der Stamm col^- , ts^+ und die Mutante "30" wurden gleichzeitig untersucht. Angekeimte Konidiensuspensionen wurden mit einer CHX-Konzentration von 100 μ g/ml behandelt (nach Sebald, 1969). Nach verschiedenen Zeiten der Inkubation mit markiertem Leucin wurden Proben entnommen und die an das Zellprotein gebundene Radioaktivität bestimmt. Fig. 9 zeigt, daß die Proteinsynthesen des kolonieförmig wachsenden Stammes und der temperatursensiblen Mutante gleichermaßen durch CHX gehemmt werden. Das Ausmaß der Hemmung mit mehr als 90 % gegenüber der Kontrolle ohne CHX ist gleich der des Wildtyps, col^+ , ts^+ .



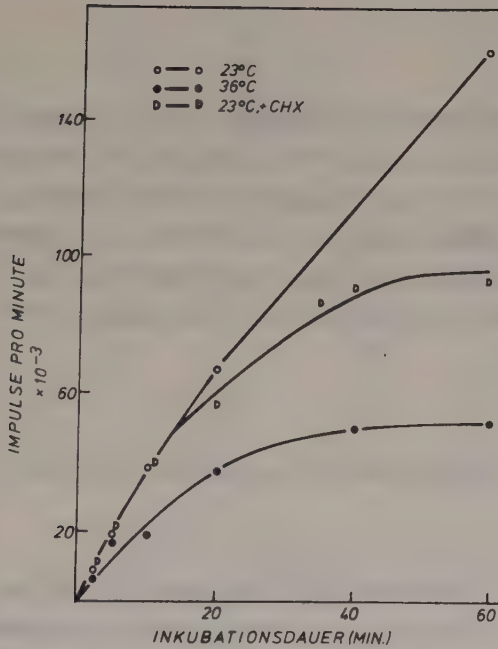
Figur 9

Kinetik des Einbaus von radioaktivem Leucin in die Proteine des Stammes col^{-}, ts^{+} und der ts^{-} -Mutante 30, col^{-}, ts^{-} , bei Inkubation ohne und mit Cycloheximid ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$):

- $\circ$ — $\circ$ col^{-}, ts^{-} , ohne CHX
- D — D col^{-}, ts^{-} , mit CHX
- $\square$ - - - $\square$ col^{-}, ts^{+} , ohne CHX
- D - - - D col^{-}, ts^{+} , mit CHX

2.5.2. Kinetik der RNS-Synthese während der Inkubation mit und ohne CHX

Um festzustellen, nach welcher Zeit die RNS-Synthese nach Unterbrechung der Proteinsynthese gehemmt wird und dies mit der Hemmung durch unerlaubte Temperatur zu vergleichen, wurde folgender Versuch unternommen: Eine angekeimte Konidiensuspension der ts^- -Mutante "30" wurde in drei Teile geteilt. Ein Teil diente als Kontrolle: die Inkorporation markierten Uridins wurde bei 23° C ohne CHX vorgenommen. Bei 23° C wurde auch die Inkubation der zweiten Teilsuspension mit 100 μ /ml CHX durchgeführt. Die dritte Suspension schließlich wurde nochmals als Vergleich bei 36° C inkubiert. Die Ergebnisse zeigt Fig. 10. Wie schon aus vorangegangenen Versuchen hervorging (siehe Fig. 5) tritt eine Hemmung der RNS-Synthese bei unerlaubter Temperatur bereits nach spätestens 2 Minuten ein. Wird hingegen die Proteinsynthese durch CHX gehemmt, so wirkt sich dies erst nach 10 bis 20 Minuten auf die RNS-Synthese aus. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen an *Saccharomyces* (Udem und Warner, 1972). Anfangs wird auch bei *Neurospora crassa* unter Einfluß von CHX noch RNS gebildet. Es kann sich dabei um ribosomale "Precursor"-RNS und um mRNS handeln.



Figur 10

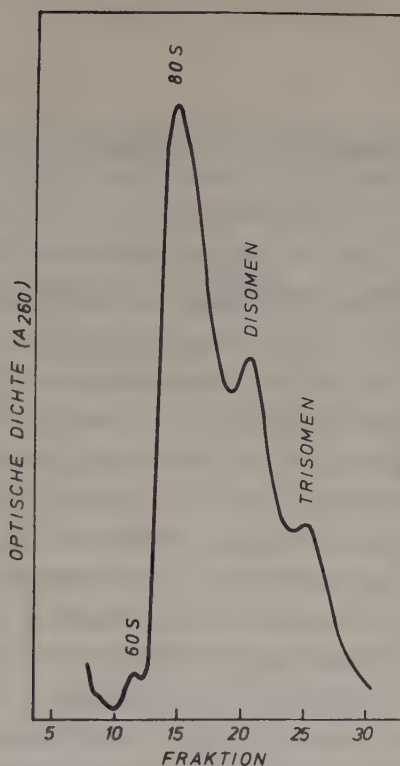
Kinetik des Einbaus von radioaktivem Uridin in die RNS der *ts*⁻-Mutante 30 bei Inkubation ohne und mit CHX bei erlaubter, sowie bei unerlaubter Temperatur.

2.6. Darstellung der Ribosomen im Saccharose-Dichtegradienten

Mindestens 80 % der gesamten Zell-RNS liegt als ribosomale RNS vor (Hartwell et al., 1970). Bei der ts^- -Mutante 30 von *Neurospora crassa* muß wegen der starken Hemmung der Transkription daher zumindest ein Defekt der ribosomalen RNS-Synthese vorhanden sein. Gegenstand der folgenden Untersuchungen waren daher die Ribosomen der Mutante.

2.6.1. Typisches Ribosomenprofil von *Neurospora crassa*

Zunächst wurde ein Ribosomenprofil der Mutante "30" von *Neurospora crassa* dargestellt und zwar ohne vorhergehende Bebrütung der Zellen bei unerlaubter Temperatur oder Behandlung mit einem Antibiotikum. Fig. 11 zeigt ein typisches Ribosomenprofil der Mutante "30" von *Neurospora crassa* bei 25° C; das Profil des Wildtyps unterscheidet sich nicht von demjenigen der Mutante bei 23° C. Deutlich ersichtlich sind die große ribosomale Untereinheit (60S), die Monosomen (80S), sowie die Polyrribosomen (Di- und Trisomen). Es wurden nie höhere Polymere als Tetrasomen beobachtet.



Figur 11

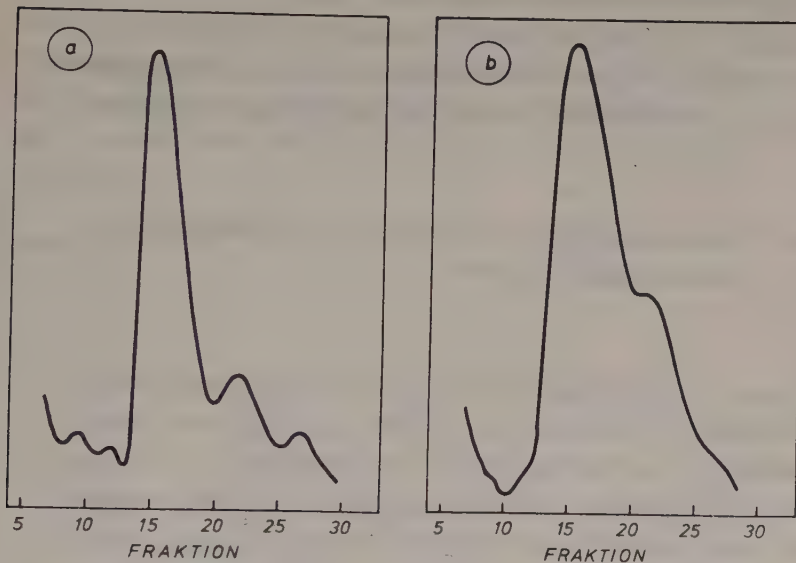
Saccharosedichtegradientenprofil cytoplasmatischer Ribosomen von *Neurospora crassa*, die von Zellen stammen, welche bei 23° C inkubiert wurden. Die nach Gefrieren in flüssigem Stickstoff durch Mörsern zerstörten Zellen wurden in Lysispuffer aufgenommen und auf isokinetische Gradienten geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte 45 Minuten lang im SW-Rotor L 50 bei 50.000 rpm und 4° C. Der Gradient wurde dann von unten ausgepumpt und die Absorption bei 260 nm (A_{260}) im Durchfluß gemessen.

2.6.2. Wirkung von Rifampicin auf die Ribosomenprofile der Mutante

Wie oben gezeigt wurde, wirkt Rifampicin sofort auf die Transkription, indem es in einer Konzentration von 100 μ g/ml sehr stark die Synthese wahrscheinlich aller RNS-Arten hemmt. Nun sollte festgestellt werden, wie und wann sich diese Hemmung in der Verteilung von Mono- und Polyribosomen (Polysomen) auswirkt. Zunächst wurde eine Konidiesuspension der Mutante 20 Minuten lang mit Rifampicin inkubiert und anschließend die Ribosomen im Saccharosegradienten zentrifugiert. Das Ergebnis gibt Fig. 12 a wieder. Die Maxima des Absorptionsprofils entsprechen den zwei ribosomalen Untereinheiten, den Monosomen-, sowie den Di- und Trisomen. Das Verhältnis von Monosomen zu Polysomen hat sich nach 20-minütiger Rifampicinbehandlung schon etwas verändert, und zwar haben die Monosomen auf Kosten der Polysomen zugenommen. Das Verhältnis der Maxima-Höhen (gemessen von der Abszisse) zwischen Mono-, Di- und Trisomen betrug ohne Antibiotikum 3,2 : 1,8 : 1 und nach 20 Minuten Inkubation mit dem Hemmstoff 5,9 : 1,7 : 1. Es hat offensichtlich schon ein Zerfall der Polysomen stattgefunden. Voraussetzung dafür ist der vorangegangene Abbau von mRNS in etwa gleichem Ausmaß.

Um festzustellen, ob der Zerfall der Polysomen weiter fortschreitet, wurden die Zellen 1 Stunde lang mit Rifampicin inkubiert und die Ribosomen im Saccharose-

gradienten dargestellt (Fig. 12 b). Die optische Dichte zeigt nun ein breites Maximum für die Monosomen, sowie Schultern für Di- und andeutungsweise Trisomen. Die Polysomen sind weiter zerfallen und die Zerfallsprodukte scheinen teilweise mit den Monosomen aggregiert zu sein.



Figur 12

Saccharosedichtegradientenprofil von Ribosomen, die aus Zellen von col^- , ts^- stammen, welche verschiedene Zeiten lang mit Rifampicin (100 μ /ml) inkubiert wurden:

a: 20 Minuten

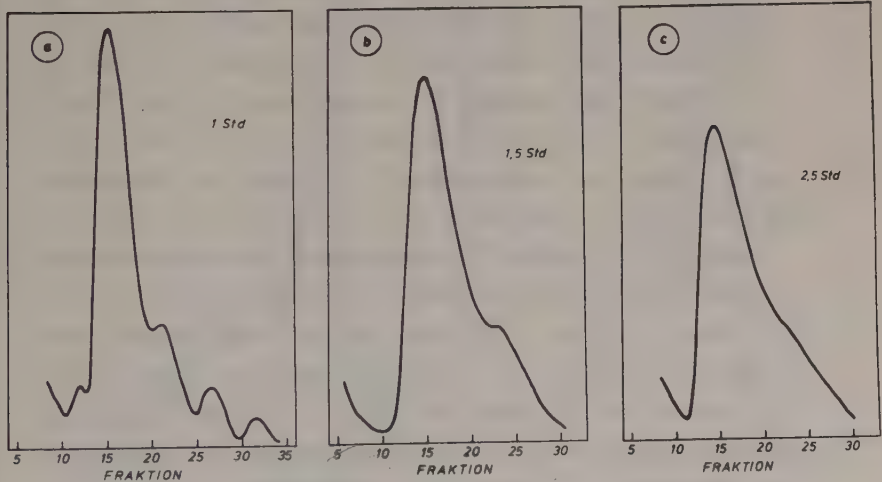
b: 60 Minuten

Ebenso wie schon für andere Organismen nachgewiesen (Dennis und Bremer, 1973, an *E. coli*, Hartwell, 1969 an *Saccharomyces*) besteht auch bei *Neurospora* eine Abhängigkeit des Polyribosomenzerfalls von der Lebensdauer der mRNA. Der Zerfall findet nicht sofort mit Hemmung der gesamten RNS-Synthese durch Rifampicin statt. Es besteht vielmehr eine Korrelation mit der Proteinsynthese, die, solange noch genügend mRNA vorhanden ist, weiterläuft. Das Verschwinden der Polyribosomen ist gleichbedeutend mit dem Aufhören der Translation (Hutchison et al., 1969).

2.6.3. Ribosomenprofil der Mutante nach Inkubation bei unerlaubter Temperatur

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, wie sich die Polysomen der ts^- -Mutante "30" nach Inkubation bei unerlaubter Temperatur verhalten. Da der Zerfall der Polysomen von der Lebensdauer der mRNA abhängig ist, sollten sich daraus Schlüsse ziehen lassen, ob die Temperatursensibilität der Mutante auch die mRNA-Synthese betrifft. Ein deutlicher Zerfall der Polysomen ist schon nach einer Stunde (Fig. 13a) ersichtlich; das Monosomen-Maximum hat auf Kosten des Polysomen-Maximums beträchtlich zugenommen. Nach 1,5 Stunden (Fig. 13b) ist der Zerfall weiter fortgeschritten und nach 2,5 Stunden bei 36° C sind in den Zellen keine Polysomen mehr festzustellen. Ähnlich wie nach Rifampicin-Behandlung, bei der die gesamte, also auch die mRNA-Synthese gehemmt wurde, kann auch hier

ein Zerfallen der Polysomen als Folge der reduzierten mRNA-Synthese angenommen werden. Der Grund dafür, daß die Polysomen noch eine Zeitlang bestehen bleiben, liegt darin, daß die noch vorhandene mRNA relativ langlebig ist. Mit dem vor der Hemmung gebildeten Messenger und den noch vorhandenen Ribosomen kann die Proteinsynthese fortgeführt werden; dies steht im Einklang damit, daß die Hemmung der Proteinsynthese erst nach 10 - 15 Minuten einsetzt (siehe Fig. 2). Hierin wird wie oben beschrieben die Korrelation zwischen der Rate des Polyribosomenzerfalls und der Rate der Proteinsynthese-Unterbrechung deutlich.

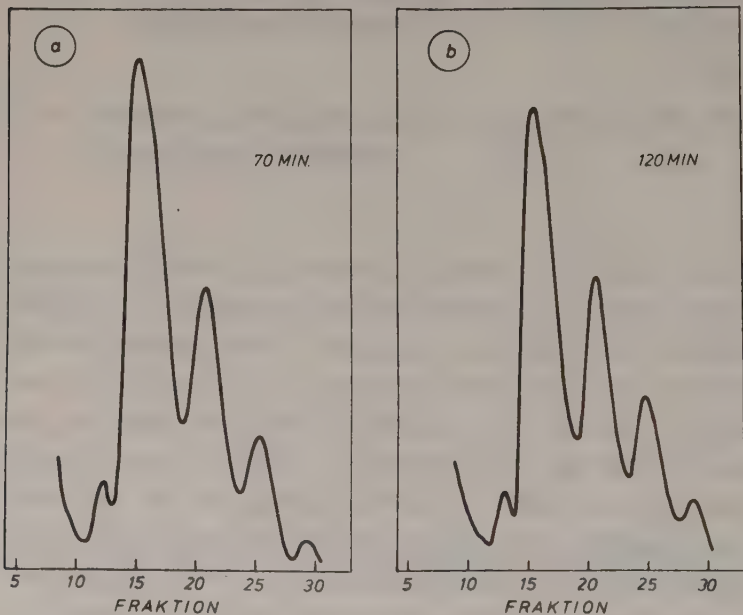


Figur 13

Saccharosedichtegradientenprofil von Ribosomen, die aus Zellen der ts^- -Mutante 30 stammen, welche verschiedene Zeiten lang bei 36°C inkubiert wurden.

2.6.4. Ribosomenprofil der Mutante nach Inkubation mit CHX bei 36° C und 23° C

Zur weiteren Charakterisierung der Mutante sollte die Wirkung von CHX auf den Polyribosomenzerfall bei 36° C untersucht werden. Da die Voraussetzung für den Zerfall ein ungehemmtes Ablaufen der Proteinsynthese ist, sollte nach Hartwell et al.(1970) CHX diesen Vorgang verhindern



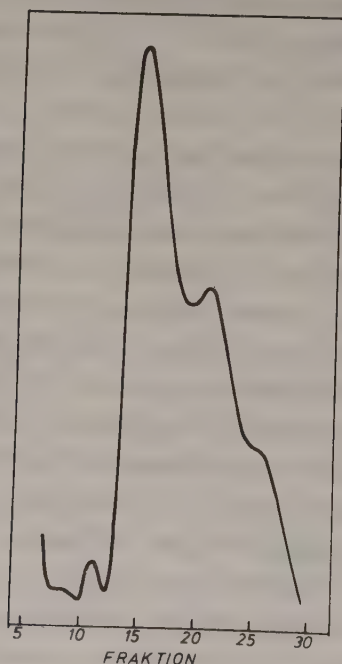
Figur 14

Stabilisierung der Polysomen der ts^- -Mutante 30 durch Inkubation mit Cycloheximid (100 μ /ml) bei der unerlaubten Temperatur.

können. CHX hemmt die Verlängerung der Polypeptidketten und zeigt wie oben beschrieben auch eine sekundäre Wirkung auf die Reifung der ribosomalen RNS; mRNA dagegen kann noch eine Zeitlang weitergebildet werden (Hartwell, et al. 1970).

Eine angekeimte Konidiensuspension der Mutante "30" wurde 70 Minuten bzw. 2 Stunden lang in Anwesenheit von CHX bei der unerlaubten Temperatur inkubiert. Wie aus Fig. 14a,b hervorgeht, kommt es bei 36° C zu einer durch CHX bedingten Stabilisierung der Polysomen, die zwischen 70 Minuten und 2 Stunden noch weiter zunimmt. Im Vergleich zur Polysomenverteilung bei normaler Temperatur ohne Antibiotikum haben dann die Di-, Tri- und Tetrasomen im Verhältnis zu den Monosomen zugenommen. Da die Proteinsynthese durch CHX gehemmt ist, kommt es nicht oder nur extrem langsam wieder zur Ablösung der Ribosomen vom Messenger des Polysoms. Die Neuuanheftung der noch im Pool vorhandenen Ribosomen an den schon vorhandenen mRNA-Polysomenkomplex überwiegt die Ablösung, und da infolge der unerlaubten Temperatur keine neue mRNA nachgeliefert wird, verschiebt sich das Verhältnis von Mono- : Polysomen zugunsten der Polysomen. Werden die Zellen bei 36° C ohne CHX inkubiert, so können die Ribosomen von den Polysomen abgelöst werden, da die Proteinsynthese weiterläuft. Neue mRNA wird ebenfalls wegen der unerlaubten Temperatur nicht nachgeliefert, aber der vorhandene Messenger kann mit seiner Halbwertszeit zerfallen. Sind alle vorhandenen Messenger dagegen mit Ribosomen besetzt, wie im Versuch bei Behandlung mit

36° C und CHX, so bieten sich nur schlechte Angriffspunkte für die Ribonucleasen (Pato et al., 1972). Die Folge davon ist die in Fig. 14 gezeigte Stabilisierung der Polysomen, noch nach zweistündiger Behandlung bei unerlaubter Temperatur. Wird die mRNS-Synthese statt durch unerlaubte Temperatur durch Rifampicin gehemmt, so ergibt sich das gleiche Bild.



Figur 15

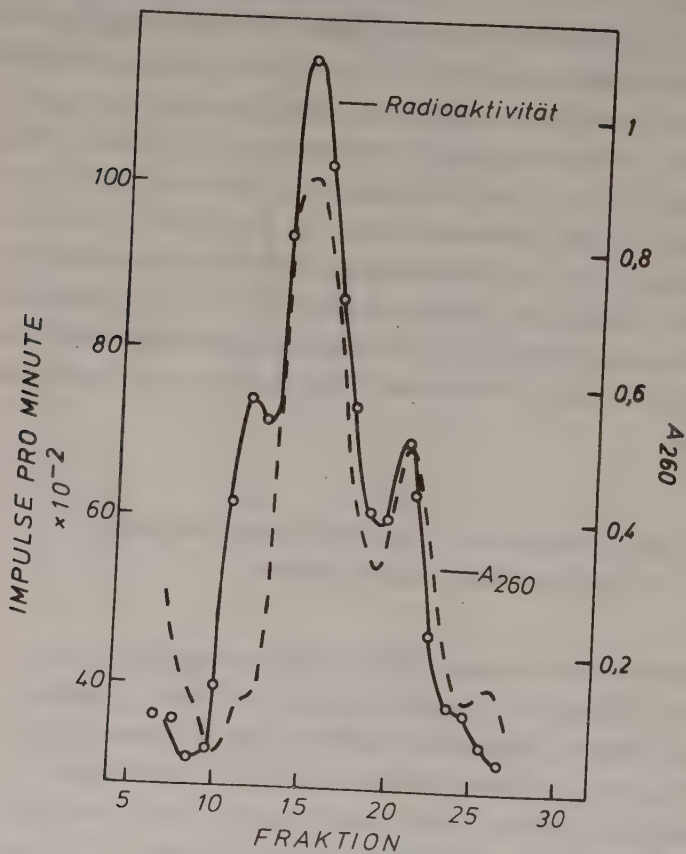
Ribosomenprofil der ts^- -Mutante 30 nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit Cycloheximid bei 23° C.

Als Vergleich sollte weiter untersucht werden, wie sich die Polysomen nach Inkubation mit CHX bei erlaubter Temperatur verhalten. Das Ribosomenprofil (Fig. 15) weist dann sehr große Ähnlichkeit mit demjenigen auf, das ohne CHX-Behandlung bei 25° C erhalten wurde (Fig. 12). Dieses Verhalten der Polysomen ist zu erwarten, wenn man annimmt, daß die ts^{-} -Mutante 30 im Gegensatz zur Behandlung bei unerlaubter Temperatur bei 25° C noch mRNA produzieren kann. Auch CHX hemmt nicht sofort die mRNA-Synthese, es wird folglich in diesem Versuch noch mRNA synthetisiert. Dieser Messenger gelangt ins Cytoplasma und die noch im Pool vorhandenen freien Ribosomen haben die Möglichkeit, sich an die in größerer Zahl vorhandenen mRNA-Moleküle festzusetzen. So kommt es nicht wie bei 36° C zu einer Häufung der Polysomen, obwohl die Proteinsynthese durch CHX unterbunden ist und die Ribosomen sich nicht von der mRNA lösen können.

2.6.5. Untersuchung des Einbaues markierten Uridins in die RNS von Mono- und Polysomen

Als Abschluß der Versuchsreihe wurde neu synthetisierte RNS mit radioaktivem Uridin markiert und bei erlaubter und unerlaubter Temperatur in Mono- und Polysomen eingebaut. Wie bei den oben beschriebenen Versuchen kamen Zellsuspensionen mit angekeimten Konidien zur Verwendung, die mit ^3H -Uridin verschiedene Zeiten lang bei 25° C bzw. 36° C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte bis nach Beendigung der Gradientenzentrifugation dieselbe Behandlung wie ohne Markierung. Nach dem Messen der optischen

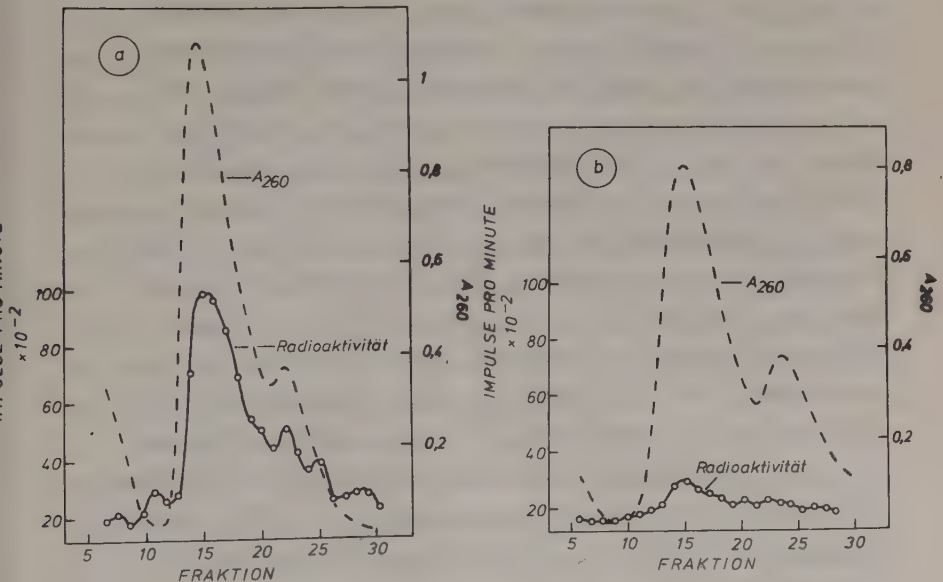
Dichte im Durchfluß wurden die einzelnen Fraktionen gesammelt, und zwar je 5 Tropfen (entsprechend 0,15ml) auf ein Filterplättchen. Die Impulse pro Minute für die einzelnen Fraktionen wurden aufgetragen und konnten den Mono- und Polysomen zugeordnet werden.



Figur 16

Ribosomenprofil der ts^- -Mutante 30 nach 15-minütiger Inkorporation von radioaktiv markiertem Uridin in RNS bei 23°C .

Ein Ribosomenprofil nach 15 Minuten langer Markierung bei 25° C zeigt Fig. 16. Eine Untereinheit, sowie Mono- und Disomen sind deutlich markiert, wobei die spezifische Radioaktivität (Ipm/A_{260}) der Monosomen größer ist, als diejenige der Disomen. Tri- und Tetrasomen sind noch nicht signifikant markiert. Das Markierungsmuster nach 30-minütiger Inkubation mit ^3H -Uridin bei 25° C verdeutlicht Fig. 17a. Nun hat vergleichsweise die spezifische Radio-



Figur 17

Ribosomenprofil der ts^- -Mutante 30 nach 30-minütiger Inkorporation von radioaktivem Uridin in RNS

a: bei 23° C

b: bei 36° C

aktivität der Polysomen gegenüber den Monosomen zugenommen. Inkubiert man 30 Minuten lang bei unerlaubter Temperatur, so ergibt sich Fig. 17b: Die in Mono- und Polysomen eingebaute Radioaktivität ist sehr gering.

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der RNS-Fractionen nach 15 - bzw. 30-minütiger Inkubation mit markiertem Uridin zeigt, daß zunächst innerhalb von 15 Minuten ein größerer Prozentsatz der Untereinheiten und Monosomen markiert wird. Nach 30 Minuten ist die spezifische Aktivität der Polysomen angestiegen, d. h. neu synthetisierte RNS gelangt zuerst in Untereinheiten und Monosomen und anschließend in Polysomen. Daraus folgt, daß es sich bei dieser neu synthetisierten RNS, deren Markierung in den Ribosomenfraktionen erscheint, um ribosomale RNS handelt. Messenger- und transfer RNS sind nicht an Untereinheiten, sondern nur an Mono- und hauptsächlich Polysomen gebunden. Weiterhin konnte nach 10-minütiger Inkubation mit markiertem Uridin noch keine Radioaktivität in den RNS-Fractionen verzeichnet werden. Auch daraus läßt sich schließen, daß die Markierung in rRNS und nicht in mRNS sitzt. Der Vergleich der Figuren 17 a und b, welche die Radioaktivität neu synthetisierter RNS in den Ribosomenfraktionen bei 23° C und 36° C darstellen, zeigt daher eine signifikante Hemmung der ribosomalen RNS-Synthese bei unerlaubter Temperatur.

3. DISKUSSION

3.1. Anwendung der Stempelmethode zur Isolierung rezessiver Mutanten von *Neurospora crassa*

In der Literatur finden sich verschiedene Methoden, auxotrophe Mutanten von *Neurospora crassa* relativ schnell selektiv zu erfassen. Beadle und Tatum (1945) kreuzten nach der mutagenen Behandlung der Konidien die ausgewachsenen Mycelien zuerst mit dem Wildtyp, um dann die erhaltenen Ascosporen zu prüfen. Nach einer vereinfachten Methode wurden Teile dieser Mycelien auf Testmedien übertragen und nur hierdurch nachgewiesene Mutanten mit dem Wildstamm gekreuzt. Günstigere Selektionstechniken für die Erfassung aller Auxotrophietypen sind Stempel-, die Schicht- und die Filtertechnik. Die Stempeltechnik wurde zuerst von Lederberg und Lederberg (1952) für Bakterien ausgearbeitet und fand später auch bei Hefen und hyphenbildenden Pilzen Verwendung, u. a. auch bei *Neurospora crassa* mit Hilfe von Nadel- und Filterpapierstempeln (Maling, 1960).

In der vorliegenden Arbeit wird eine Stempeltechnik mit Samtstempel für *Neurospora crassa* als Selektionsmethode für temperatursensible Mutanten ausgearbeitet, wie sie auch bei Bakterien und Hefen angewendet wird. Voraussetzung dafür ist die Verwendung eines kolonieförmig wachsenden Stammes, dessen Kolonien sich in Form von Konidien präzise abgegrenzt auf neues Medium übertragen lassen. Nach Bebrütung bei der selektiven Temperatur kann jede ts^- -Mutante eindeutig als nicht gewachsen identifiziert werden.

3.2. Versuchsergebnisse, die auf einen primären temperatursensiblen Defekt der Transkription mit Sekundärwirkungen auf Protein- und DNS-Synthese schließen lassen

Unter den gewonnenen temperatursensiblen Mutanten von *Neurospora crassa* schien eine Mutante sehr interessant für weitere Charakterisierungen zu sein. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß es sich um den Ausfall einer "indispensable" Funktion handeln mußte. Die Untersuchung der Protein- und Nucleinsäure-Synthese erfolgte mit Hilfe von Einbaukinetiken radioaktiv markierten Leucins in die Proteine und markierten Uridins in RNS, sowie dessen Umwandlungsprodukt in DNS. Die Kinetiken der Protein- und Nucleinsäuresynthese weisen nach, daß nach Inkubation bei unerlaubter Temperatur zuerst die Hemmung der RNS-Synthese und erst danach diejenige von Protein- und DNS-Synthese eintreten. Das gleiche Ergebnis zeigt ein Modellversuch, in dem anhand des Antibiotikums Rifampicin die Kinetik der direkten Hemmung der Transkription dargestellt wird. Im Gegensatz zu dem primär die Proteinsynthese angreifenden Cycloheximid weist, wie in einem weiteren Modellversuch dargestellt wird, die ts^- -Mutante "30" von *Neurospora crassa* eine Sekundärwirkung auf die Proteinsynthese auf. Derselbe Effekt wurde von Hutchison und Mitarbeitern (1969) bei der temperatursensiblen Mutante 136 von *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt. Bei dieser Mutante liegt ebenfalls ein primärer Defekt der RNS-Produktion bei 36° C vor, der

sich sekundär auf die Rate der Proteinsynthese auswirkt. Für eine Sekundärwirkung des temperatursensiblen Defektes auf die Replikation sprechen ebenfalls die Kinetiken. Erst nach Hemmung sowohl der RNS-, als auch anschließend der Proteinsynthese setzt die Hemmung der DNS-Synthese ein. Da dies erst 10 Minuten nach Unterbrechung der Proteinsynthese geschieht, kann die Hemmung der DNS-Synthese als Folge der ausgefallenen Proteinsynthese erklärt werden. Im Einklang damit stehen Versuche von Grossmann und Mitarbeitern (1969), die fanden, daß bei Hefen kontinuierliche Proteinsynthese während der Kern-DNS-Replikation erforderlich ist. Die Auswirkung einer Proteinsynthese-Hemmung auf die DNS-Synthese von *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben Hereford und Hartwell (1973), während neuere Arbeiten an Bakterien auch eine mögliche direkte Verwicklung der RNS-Synthese in die Initiation der DNS-Replikation aufzeigen (z.B. Lark, 1972).

3.3. Hinweise für einen Defekt in der Synthese der messenger RNS

Temperatursensible Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* mit einem Defekt in der ribosomalen RNS-Synthese sind von Hartwell et al. (1970) isoliert und charakterisiert worden. Mutanten, bei denen nicht gleichzeitig die messenger RNS-Synthese gehemmt war, wiesen 2 - 4 Stunden nach Inkubation bei unerlaubter Temperatur ungehemmte Proteinsynthese auf.

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Mutante Nr. 30 von *Neurospora crassa* zeigt die Kinetik der Proteinsynthese bei 36° C bereits eine Hemmung nach 10 - 15 Minuten. Dies läßt sich mit einem Defekt in der mRNA-Synthese erklären. Ein weiterer Hinweis ergibt sich, wenn man die RNS-Synthese der Mutante nach Inkubation mit CHX oder der unerlaubten Temperatur mißt. Während bei 36° C die Hemmung nach spätestens 2 Minuten eingesetzt hat, läuft die RNS-Synthese nach CHX-Behandlung noch mindestens 15 Minuten ungestört weiter. Wie Untersuchungen von Udem und Warner (1972) und Mayo et al. (1968) an Hefe gezeigt haben, ist für die Reifung der ribosomalen RNS kontinuierliche Proteinsynthese erforderlich. Nur ribosomale "precursor" RNS kann noch kurze Zeit hergestellt werden, bis es zu einer schnellen "feedback"-Hemmung auch dieser hochmolekularen Vorstufe der rRNS kommt. Wie die Kinetiken in dieser Arbeit zeigen, läuft auch bei *Neurospora crassa* unter CHX-Hemmung noch eine Zeitlang die RNS-Synthese weiter, wobei es sich um rRNS-Vorstufen und um eine Akkumulation von mRNA handeln kann, wie dies von Hartwell et al. (1970) für *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt wurde.

An verschiedenen Organismen ist nachgewiesen worden, daß es bei einer Hemmung der Synthese von mRNA zum Zerfall der Polyribosomen zu Monoribosomen kommt, und zwar in Abhängigkeit von der Halbwertszeit der mRNA. Diese Erscheinung wurde an Rattenleber von Staehlin et al. (1963), an *Bacillus subtilis* von Zimmermann und Levinthal (1967) und an der temperatursensiblen Mutante ts⁻136 von *Saccharomyces cerevisiae* (Hutchison et al., 1969) beobachtet.

Die Halbwertszeit der mRNA dieser Hefe beträgt 23 Minuten und parallel zum Abbau der Polyribosomen zu Monoribosomen nimmt auch die Rate der Proteinsynthese in dieser Zeit ab. Bei der Mutante Nr. 30 von *Neurospora crassa* kommt es bei der unerlaubten Temperatur ebenfalls zu einem Zerfall der Polyribosomen, und zwar nicht in so kurzer Zeit, wie bei der Mutante ts^{-187} von *Saccharomyces cerevisiae* innerhalb von 2 Minuten, daß man einen Defekt in der Initiation von Polypeptidketten annehmen müßte. Die Polyribosomen zerfallen wie bei der Mutante ts^{-136} von *Saccharomyces cerevisiae* mit der Halbwertslebenszeit der mRNA, die auch bei *Neurospora crassa* etwas länger als 20 Minuten dauert. Da bei der Mutante Nr. 30 ribosomale und messenger RNS-Synthese bei unerlaubter Temperatur gestört sind, ist ein möglicher Defekt in einer RNS-Polymerase unwahrscheinlich. Bei höheren Organismen existieren RNS-Polymerasen, spezifisch für mRNA bzw. rRNA. Es ist deshalb nicht anzunehmen, daß bei der Mutante gleichzeitig zwei verschiedene Polymerasen temperatursensibel sind.

3.4. Verwendungsmöglichkeiten der Mutante für weitere Forschungen

Für die untersuchte temperatursensible Mutante von *Neurospora crassa* wurde ein primärer Defekt in ribosomaler und messenger RNS-Synthese nachgewiesen. Über eine mögliche Synthese-Hemmung auch der transfer RNS kann keine Aussage gemacht werden. Die Ursache für temperatursensible RNS-

Synthesen liegt meistens in veränderten Proteinen, die am Regulationsprozess beteiligt sind (Khesin et al., 1968). Da wie oben ausgeführt eine temperatursensible RNS-Polymerase unwahrscheinlich ist, kann in der Veränderung eines an der Transkription beteiligten Faktors der Grund für die Temperatursensibilität zu suchen sein. Solche Faktoren, wie beispielsweise diejenigen für Initiation und Termination von RNS-Ketten, sind an der Kontrolle der Gen-expression beteiligt (Burgess, 1971). Eine weitere Untersuchung der Mutante 30 könnte Aufschlüsse über Regulation und Kontrolle der Genwirkung bei Eukaryonten auf der Ebene der Transkription geben. Auch der Prozess der Ribosomenbiosynthese als Beispiel für nucleocytoplasmatische Interaktionen könnte weiter erforscht werden. Zahlreiche Schritte sind zur Bildung eines funktionsfähigen Ribosoms erforderlich, angefangen bei der Synthese der "Precursor"-Moleküle und deren Reifung, sowie der Synthese der ribosomalen Proteine, bis zu deren Akkumulation und Transport vom Kern ins Cytoplasma. Bei Hemmung einer dieser Schritte sollten Einblicke in die kontrollierenden Regulationsmechanismen gewonnen werden können, die für die Koordination der einzelnen Synthesen verantwortlich sind. Auch Untersuchungen über die vielfältigen Interaktionen zwischen Mitochondrien und Cytoplasma könnten mit der Mutante "30" durchgeführt werden. Mitochondrien von *Neurospora crassa* enthalten u. a. Ribosomen und ribosomale Untereinheiten, die sich von den cytoplasmatischen unterscheiden. Abgesehen von Unterschieden in fast allen ihren Proteinen (Küntzel, 1969)

weisen beide Typen von Ribosomen noch unterscheidbare RNS auf; in Mitochondrien wurde 25 S und 19 S RNS gefunden (Rifkin et al., 1967). Die Gene für diese rRNS liegen auf der mitochondrialen DNS - die ribosomalen Mitochondrienproteine werden an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert. Wiederum sind zahlreiche Kontrollmechanismen für die Reifung eines Ribosoms erforderlich. Nach Klärung der Frage, ob bei der Mutante "30" auch eine Temperatursensibilität der mitochondrialen Transkription vorliegt, könnten weitere Untersuchungen über die Regulation der mitochondrialen Ribosomenbiosynthese durchgeführt werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Materialien

Cycloheximid: Serva GmbH, Heidelberg 1-Nitroso-3 nitro-1 methylguanidin (NG): Kepplar und Reif, Steinheim

Rifampicin, pharm:"Lepetit": Serva GmbH, Heidelberg, isoliert nach Meilhac, M. et al. (1972)

Radioaktiv markiertes Leucin und Uridin: Radiochemical Centre, Amersham, England

Saccharose: Merck A.G., Darmstadt und RNase-freie S. von Serva

PPO: Packard Instrument GmbH, Frankfurt

Dimethyl-POPOP: "

4.2. Medien

Vogel's Minimal 50 x: 150 g $\text{Na}_3\text{-citrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 250 g KH_2PO_4 , anhydrous, 100 g NH_4NO_3 , 10 g $\text{Mg SO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$, 750 ml aqua dest., 5 ml Trace Element Solution, 2,5 ml Biotin Solution, 2 ml Chloroform

Glycerol complete 4 x: 980ml aqua dest., 20 ml Vogels Minimal, 40 ml Glycerin, 40 ml Vitaminlösung, 10 g Yeast extract, 4 g Casamino acids

4.3. Züchtung von *Neurospora crassa*

Stämme: 74 a (7) re und

398-28, pe, al, ab, A, "col-25": Institut für Physiologische Botanik, Uppsala. Für die Züchtung der Hyphen

in Flüssigmedium (Vogel's Minimalmedium + 1,5 % Glucose) wurde unter sterilen Bedingungen mit 5×10^6 Konidien pro Milliliter Zuchtmedium inoculiert. Die Kulturen wurden jeweils 18 Stunden lang bei 25°C belüftet.

4.4. Inkubation mit Nitrosoguanidin

Am Vortage des Versuchs wurde eine Konidiensuspension des Stammes "col-25" in Tris $\text{p}_\text{H} 6$ mit einem Titer von $1 \times 10^7/\text{ml}$ angefertigt. Die Nitrosoguanidinlösung wurde kurz vor Beginn des Versuchs in Tris $\text{p}_\text{H} 6$ hergestellt (Konzentration: 0,5 mg/ml).

Für die Inkubation wurden im Wasserbad bei 31°C 1,8 ml der Konidiensuspension und 0,2 ml der NG-Lösung zusammengegeben, wobei die NG-Konzentration $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ betrug. Die nach verschiedenen Inkubationszeiten entnommenen Proben wurden in Eiswasser geschockt, um die Reaktion weitgehend zu unterbinden, verdünnt und 0,1 ml auf GC-Platten plattiert.

4.5. Isolierung und Reinigung der Mutanten

Für die Induzierung von Mutanten wurden Konidiensuspensionen 10 Minuten lang mit NG inkubiert und in einer solchen Verdünnung auf GC-Platten plattiert, daß annähernd 100 Kolonien pro Platte zu erwarten waren. Die

Kolonien wurden auf je 2 Platten überstempelt, von denen eine bei 25° C, die andere bei 37° C bebrütet wurde. Die bei 25° C, nicht jedoch bei 37° C gewachsenen Kolonien wurden isoliert, zur Reinigung erneut eine Kondiensuspension hergestellt und in 4 verschiedenen Konzentrationen plattiert. Die Einzelkolonien wurden wiederum auf ihr Wachstum bei 25° C und 37° C geprüft und endgültig in GC-Schrägröhrchen isoliert.

4.5.1. Kieselgelkulturen

Zur längeren Aufbewahrung der isolierten temperatursensiblen Mutanten wurden Kieselgelkulturen hergestellt. Schraubdeckelröhrchen wurden zur Hälfte mit Silicagel (Kieselgel 0,2 - 0,5 mm, Merck) gefüllt und offen im Trockenschrank sterilisiert. Die Röhrchendeckel wurden getrennt in Petrischalen autoklaviert und mit CoCl_2 getrocknet. Von jeder Mutante wurde eine Kondiensuspension in 1 ml 12,5 %iger Skim Milk (15 Min. autoklaviert) hergestellt und davon je 0,2 ml in die Kieselgelröhrchen pipettiert. Nach sofortigem Umrühren wurde 2 - 3 Tage lang getrocknet; dann wurden die Röhrchen zugeschraubt, mit Parafilm abgedichtet und im Kühlraum aufbewahrt.

4.6. Untersuchung der Keimungsfähigkeit

Reagenzgläser mit je 1 ml Minimal-Flüssigmedium wurden mit Konidien der verschiedenen Mutanten beimpft. Zur Kontrolle wurde aus diesen Proben pro Mutante je 0,1 ml auf 2 GC-Platten plattiert, wobei eine bei 25° C, die

andere bei 37° C bebrütet wurde. Die Reagenzgläser mit den restlichen Konidiensuspensionen wurden einen Tag lang geschüttelt und anschließend mikroskopisch nachgeprüft, ob die Konidien schon Keimschläuche ausgebildet hatten. War dies der Fall, so wurden die gekeimten Konidien plattiert und bei 25° C und 37° C bebrütet.

4.7. Inkorporation und Radioaktivitätsmessung des markierten Leucins und Uridins

Für die Zeitkinetiken wurden jeweils 18 Stunden lang in Flüssig-Minimalmedium gewachsene Zellen verwendet (Titer 1×10^7). Vor Versuchsbeginn wurde die Kultur auf verschiedene sterile Belüftungsflaschen verteilt, die dann unterschiedlichen Bedingungen wie Temperatur und Antibiotikainkubation ausgesetzt werden konnten. Das radioaktiv markierte Leucin bzw. Uridin wurde zum Zeitpunkt 0 in die Suspensionen pipettiert. Für die Untersuchung der Proteinsynthese wurden die nach verschiedenen Zeiten entnommenen Proben in eiskaltes unmarkiertes Leucin pipettiert und anschließend 1/2 Stunde lang in 8%iger TCA-Lösung gekocht.

Für die Bestimmung der RNS- und DNS-Synthese wurden die Proben in 5 %iger eiskalter TCA-Lösung 1 Stunde lang stehengelassen. Die Untersuchung der DNS-Synthese erforderte zusätzlich die vorherige Hydrolyse der RNS-counts. Hierfür wurden die Proben in 0,5 N Na OH mindestens 16 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Alle Proben wurden anschließend auf Sartorius Membranfilter (Porendurchmesser $0,2 \mu$) gesaugt und mehrmals mit aqua dest. und 6 %iger TCA gewaschen. Die getrockneten Filter wurden in Scintillatorgläschen mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit [Toluol + PPO (5 g/l) + POPOP (0,3 g/l)] gegeben und die Radioaktivität in einem Packard-Tricarb-Scintillationszähler mindestens 10 Minuten lang gemessen.

4.8. Darstellung der Ribosomen im Saccharose-Dichtegradienten

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden die Konidien 18 - 24 Stunden lang in Flüssig-Minimalmedium gezüchtet, den verschiedenen Versuchsbedingungen ausgesetzt und abfiltriert. Das Aufschließen der Zellen erfolgte durch Mörsern in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurden sie in kaltem Wasser und Lysispuffer nach van der Zeijst, A.M. et al. (1972) im Verhältnis 1 : 1 suspendiert, in Nedlerbecher gefüllt und eingefroren. Bei Bedarf wurde das Lysat aufgetaut und je 0,5 ml auf einen isokinetischen Saccharosegradienten gegeben (nach van der Zeijst, A.M. et al., 1972). Das Volumen des Gradienten betrug 5 ml; als Vorlage dienten 27,6 ml 15 %ige Saccharose (in Lysispuffer und Wasser 1 : 1), das Reservoir enthielt 50 ml 38 %iger Saccharose. Die Auftrennung der in dem Lysat enthaltenen Ribosomen erfolgte durch 45-minütiges Zentrifugieren des Gradienten in einem Spinco-Rotor SWL 50 bei 50000 RPM in der

Ultrazentrifuge (Spinco Modell L/L2, Fa. Beckman Instruments) und 4° C. Durch Auspumpen wurde der Gradient fraktioniert und dabei die Absorption bei 260 nm (A_{260}) im Durchfluß gemessen (Gerät: UVICORD II; LKB, Stockholm). Waren die Ribosomen eines Gradienten radioaktiv markiert, so wurden die Fraktionen nach Messung der Absorption gesammelt, und zwar durch Auftropfen von 5 Tropfen (= 0,15 ml) pro Filter (Whatman 3 MM, $\varnothing$ 22 mm). Nach dem Trocknen wurden die Filter 1/2 Stunde lang in eiskalter 10%iger TCA geschüttelt, mehrmals in TCA und abschließend in Äthanol-Äther gewaschen und wiederum getrocknet. Dann wurden sie in die Scintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität gemessen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Unter Verwendung eines kolonieförmig wachsenden Stammes, col-25, von *Neurospora crassa* wurden mit Hilfe der Stempelmethode nach Induzierung mit Nitrosoguanidin temperatursensible Mutanten isoliert. Ihre Kolonien, die auch auf Vollmedium bei unerlaubter Temperatur (36°C) nicht zu wachsen vermögen, weisen einen Defekt in einer indispensable Funktion auf.
2. Die Untersuchungen ihrer Proteinsynthese erfolgte mit Hilfe des Einbaues radioaktiv markierten Leucins bei erlaubter (23°C) oder unerlaubter Temperatur. Die Einbaurate bei 36°C weist für den Stamm ($\text{col}^{-}, \text{ts}^{+}$) und die gewonnenen ts-Mutanten ($\text{col}^{-}, \text{ts}^{-}$) eine Steigerung auf. Nur eine Mutante (Nr."30") zeigt als Ausnahme deutliche Verminderung des Leucineinbaus. Die Hemmung ihrer Proteinsynthese beginnt nach etwa 10 Minuten.
3. Zur Untersuchung der Transkription und Replikation dieser Mutante wurde markiertes Uridin oder sein Umwandlungsprodukt in RNS- und DNS eingebaut. Die RNS-Synthese zeigt bei Inkubation in unerlaubter Temperatur eine schnelle Hemmung, die schon nach spätestens 2 Minuten einsetzt. Die Hemmung der DNS-Synthese dagegen beginnt erst nach 20 Minuten.

4. Rifampicin hemmt auch die cytoplasmatische RNS-Synthese von *Neurospora crassa* und zwar sowohl bei Stamm 74 a (7) re, als auch beim kolonieförmig wachsenden Stamm col-25. Nach Inkubation des Wildtyps und der ts^{-} -Mutante 30 mit Rifampicin bei erlaubter Temperatur weisen die Kinetiken für RNS-, DNS- und Proteinsynthese gleichen Verlauf wie nach Inkubation der Mutante bei unerlaubter Temperatur auf. Einziger Unterschied ist eine Steigerung des Einbaus bei 36° C vor Beginn der Hemmung.
5. Das Antibiotikum Cycloheximid hemmt die cytoplasmatische Proteinsynthese des Wildtyps und des kolonieförmig wachsenden Stammes col-25 nahezu vollständig. Die Messung der RNS-Synthese ergibt, daß sich die Hemmung der Proteinsynthese mit Cycloheximid erst nach etwa 15 Minuten auf die Transkription auswirkt. Dies schließt einen primären temperatursensiblen Defekt der Proteinsynthese der Mutante "30" aus, da bei ihr die RNS-Synthese bereits nach 2 Minuten gehemmt ist.
6. Ribosomen wurden im Saccharose-Dichtegradienten dargestellt, und zwar getrennt als Untereinheiten, Mono- und Polysomen. Bei *Neurospora crassa* liegen zum größeren Teil Monosomen vor, außerdem Di-, Tri- sowie Tetrasomen. Höhere Polymere werden nicht beobachtet. Wird die temperatursensible Mutante bei unerlaubter Temperatur oder mit Rifampicin inkubiert, so zerfallen die Polysomen zu Monosomen. Erfolgt die Inkubation dagegen gleichzeitig bei 36° C und mit Cycloheximid, so wird der Zerfall verhindert, die

Polysomen werden stabilisiert. Inkubation bei 23° C mit Cycloheximid ergibt ein normales Ribosomenprofil wie ohne Antibiotikum.

7. Neu synthetisierte RNS kann mit radioaktivem Uridin markiert, und, sofern sie in die Ribosomen gelangt, im Saccharose-Dichtegradienten dargestellt werden. Nach 30 Minuten langer Inkubation von Zellen der Mutante 30 ergibt sich bei erlaubter Temperatur eine Verteilung der Radioaktivität, die der Absorptionsmessung bei 260 nm entspricht - Untereinheiten, Mono- und Polysomen sind markiert. Wird dagegen die Markierung bei unerlaubter Temperatur durchgeführt, so gelangt nahezu keine neu synthetisierte RNS mehr in die Ribosomen.
8. Die Ergebnisse werden als Beweis diskutiert, daß die Mutante 30 einen temperaturempfindlichen Defekt der mRNS- und rRNS-Synthese aufweist. Ihre Bedeutung für weitere Untersuchungen wird erläutert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- BARATH, Z., Küntzel, H.: Induction of Mitochondrial RNA Polymerase in *Neurospora crassa*. *Nat. New. Biol.* 240, 195 (1972)
- BARATH, Z., Küntzel, H.: Cooperation of Mitochondrial and Nuclear Genes Specifying the Mitochondrial Genetic Apparatus in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 1371 (1972)
- BAZILL, G. W., Karamata, D.: Temperature-Sensitive Mutants of *Bacillus subtilis* Defective in Deoxyribonucleotide Synthesis. *Molec. Gen. Genetics* 117, 19 (1972)
- BEYERSMANN, D., Schlicht, M., Schuster, H.: Temperatur-sensitive Initiation of DNA Replikation in a Mutant of *Escherichia coli* K 12. *Molec. Gen. Genetics* 111, 145 (1971)
- BURGESS, R. R.: RNA-Polymerase. *Annu. Rv. Biochem.* 40, 711 (1971)
- CAMPBELL, A.: Sensitive Mutants of Bacteriophage λ . *Virology* 14, 22 (1961)
- DENNIS, P., Bremer, H.: Ribosomal RNA Chain Growth Rate. *J. Molec. Biol.* 75, 145 (1973)
- FRIDLAND, A.: DNA Precursors in Eucariotic Cells. *Nat. New Biol.* 243, 105 (1973)
- GRIVELL, A. R., Jackson, J. F.: Thymidine Kinase: Evidence for its Absence from *Neurospora crassa* and some other Microorganisms, and the Relevance of this to the Specific Labelling of Deoxyribonucleic Acid. *J. Gen. Microbiol.* 54, 307, (1968)

GROSSMANN, L. J., Goldring, E. S., Marmur, J.: Preferential Synthesis of Yeast Mitochondrial DNA in the Absence of Protein Synthesis. *J. Molec. Biol.* 46, 367 (1969)

HARTWELL, L. H.: Macromolecule Synthesis in Temperature-sensitive Mutants of Yeast. *J. Bacteriol.* 93, 1662 (1967)

HARTWELL, L. H., Mc Laughlin, C. S.: A Mutant of Yeast Apparently Defective in the Initiation of Protein Synthesis *Proc. Natl. Acad. Sci* 62, 468 (1969)

HARTWELL, L. H., Hutchison, H. T., Holland, T. M., Mc Laughlin, C. S.: The Effect of Cycloheximide Upon Polyribosome Stability in Two Yeast Mutants Defective Respectively in the Initiation of Polypeptide Chains and in Messenger RNA Synthesis, *Molec. Gen. Genetics* 106, 347 (1970).

HARTWELL, L. H., Mc Laughlin, C. S., Warner, J. R.: Identification of Ten Genes that control Ribosome Formation in Yeast. *Molec. Gen. Genetics* 109, 42, (1970).

HEREFORD, L. M., Hartwell, L. H.: Defecitive DNA Synthesis in Permeabilized Yeast Mutants. *Nat. New Biol.* 234, 171 (1971)

HEREFORD, L. M., Hartwell, L. H.: Role of Protein Synthesis in the Replication of Yeast DNA. *Nat. New Biol.* 244, 129 (1973)

HIROTA, Y., Mordoh, J., Jacob, F.: On the Process of Cellular Division in *Escherichia coli*. *J. Molec. Biol.* 53, 369 (1970)

Hutchison, H. T., Hartwell, L. H., Mc Laughlin, C. S.: A Temperature-sensitive Yeast Mutant defective in RNA Production. *J. Bacteriol.* 99, 807 (1969)

JEGGO, P. A., Unrau, R, Banks, G. R., Holliday, R.: A Tem-

- perature-sensitive DNA Polymerase Mutant of *Ustilago maydis*. *Nat. New Biol.* 242, 14 (1973)
- KHESIN, R. B., Mindlin, S. Z., Gorlenko, Z. G. M. Ilyina, T. S.: Temperature Sensitive Mutations Affecting RNA Synthesis in *E. coli*. *Molec. Gen. Genetics* 103, 194 (1968)
- KÜNTZEL, H.: Proteins of Mitochondrial and Cytoplasmic Ribosomes from *Neurospora crassa*. *Nature* 222, 142 (1969)
- KØLMARK, H. G., Kilbey, B. J.: Kinetic Studies of Mutation Induction by Epoxides in *Neurospora crassa*. *Molec. Gen. Genetics* 101, 89 (1968)
- LARK, K. G.: Evidence for the Direct Involvement of RNA in the Initiation of DNA Replication in *Escherichia coli* 15 T⁻, *J. Molec. Biol.* 64, 47 (1972)
- LEDERBERG, J., LEDERBERG, E. M.: Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants. *J. Bacteriol.* 63, 399 (1952)
- MALING, B. D.: Replica Plating and Rapid Ascus Collection of *Neurospora*. *J. Gen. Microbiol.* 23, 257 (1960)
- MEILHAC, M., Typser, Z., Chambon, P.: Animal DNA-Dependent RNA Polymerases. 4. Studies on Inhibition by Rifampycin Derivates. *Eur. J. Biochem.* 28, 291 (1972)
- MAURO, E. di.: Rifampicin Sensitivity of the Component of DNA-dependent RNA-Polymerase. *Nature* 222, 533 (1969)
- MAYO, V. S., Andrean, B. A. G., De Kloet, S. R.: Effects of Cycloheximide and 5-Fluoruracil on the Synthesis of Ribonucleic Acid in Yeast. *Biochem. Biophys. Acta* 169, (1968)
- NAHA, P. M.: Early Functional Mutants of Mammalian Cells. *Nat.*

New Biol. 241, 13 (1973)

PATO, M. L., Bennet, P. M., v. Meyenburg, K.:

Messenger Ribonucleic Acid Synthesis and Degradation in *Escherichia coli* during Inhibition of Translation. J. Bacteriol. 116, 710 (1973)

PATO, M. L., Von Meyenburg, K.: Residual RNA Synthesis in *Escherichia coli* after Inhibition of Initiation of Transcription by Rifampicin. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 35, 487 (1970)

RIFKIN, M. R., Wood, D. D., Luck, D. J.: Ribosomal RNA and Ribosomes from Mitochondria of *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 1025 (1967)

SEBALD, W.: Über den Einbau von Aminosäuren in Mitochondrien aus dem Flugmuskel der Wanderheuschrecke und aus dem Wildtyp und der cytoplasmatischen Mutante mi-1 von *Neurospora crassa* in vitro und in vivo unter der Wirkung von Cycloheximid. Doktorarbeit München 1969.

STAEHLIN, O., Wettstein, T., Noll, H.: Breakdown of Rat Liver Ergosomes in vivo after Actinomycin Inhibition of Messenger RNA Synthesis, Science 140, 180 (1963)

TABER, R. L., Vincent, W. S.: Effects of Cycloheximide on Ribosomal RNA Synthesis in Yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, (1969)

TOCCHINI-VALENTINI, G. P. Marino, P., Colvill, A. J.: A Mutant of *Escherichia coli* containing an altered DNA-dependent RNA Polymerase. Nature 220, 275 (1968)

- UDEM, S. A., Warner, J. R.: Ribosomal RNA Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Molec. Biol. 65, 227 (1972)
- UNRAU, P., Holliday, R.: A Search for Temperature-sensitive Mutants of *Ustilago maydis* blocked in DNA Synthesis. Genet. Res. 15, 157 (1970)
- WARNER, J. R., Udem, S. A.: Temperature Sensitive Mutations Affecting Ribosome Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Molec. Biol. 65, 243 (1972)
- WOOD, D. D., Luck, D. J. L.: Hybridization of Mitochondrial Ribosomal RNA. J. Molec. Biol. 41, 211 (1969)
- ZIMMERMANN, R. A. Levinthal, C.: Messenger RNA and RNA Transcription Time. J. Molec. Biol. 30, 349 (1967)
- VAN DER ZEIJST, B. A. M., Kool, A. J. Bloemers, H. P. J.: Isolation of Active Ribosomal Subunits from Yeast. Eur. J. Biochem. 30, 15 (1972)

LEBENS LAUF

Geboren am 15. September 1945 in Waltershausen/Thüringen

Namen der Eltern: Werner Sloot und Gerda Sloot, geb. Launer

1952 - 1956 Volksschule in Frankfurt am Main

1956 - 1965 Gymnasium in Frankfurt, Abschluß mit
mit Abitur

1965 - 1966 Studium des Faches Biologie an der Johann
Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt

1966 - 1970 Studium der Biologie an der Ludwig-Maxi-
milians-Universität in München

1967 Diplom-Vorprüfung in Biologie

1970 Diplom-Biologen-Hauptprüfung

1971 Beginn der Doktorarbeit am Institut für
Genetik

